MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1955 — 1956

TOMO XXVII

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1955 — 1956

TOMO XXVII

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

AS "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" são destinadas à publicação de trabalhos realizados no Instituto ou com a sua contribuição. Os trabalhos são dados à publicidade logo após a entrega e reunidos anualmente num volume.

Serão fornecidas, a pedido, separatas dos trabalhos publicados nas "Memórias", solicitando-se nesse caso o obséquio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

Toda a correspondência editorial deve ser dirigida ao:

Redactor das "Memórias" do
INSTITUTO BUTANTAN
Caixa Postal 65
S. Paulo, S. P., BRASIL.

PEDE-SE PERMUTA
EXCHANGE DESIRED.

AVISO

Conforme consta do Decreto No. 24.401/55, o Governo de São Paulo, levando em conta a grave situação financeira do Estado, resolveu, por medida de economia, proibir a publicação de revistas e trabalhos por conta da dotação orçamentária de 1955. Por este motivo, não pôde ser impresso, no exercício passado, o presente volume das "Memórias".

ÍNDICE

Mem. Inst. Butantan,
27:1-39. 1955/6.

UMA CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA ESTRUTURA ULTRA-FINA E DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS DE FIBRILAS DO TECIDO CONJUNTIVO ANIMAL.

P. SOUZA SANTOS*, H. SOUZA SANTOS**, G. A. EDWARDS***, A. R. HOGE****
& P. SAWAYA***.

INTRODUÇÃO

Colágeno é o principal constituinte protêico dos tecidos conjuntivos compacto e frouxo. Ocorre seja como uma rêde de fibrilas de aproximadamente um micro de espessura e de vários micra de comprimento, associado com a maioria dos tecidos em toda a série animal, seja como feixes grossos formando tendões (1). É insolúvel em água, em solventes orgânicos e, geralmente, em soluções diluidas de álcales e ácidos a temperaturas normais. A ação prolongada de água quente transforma o colágeno em gelatina, uma reação química de grande importância, da qual derivou o próprio têrmo (colágeno significa "gerador de cola").

Outra propriedade característica do colágeno é seu aumento de volume sob a ação de ácidos e álcales diluidos (3).

A composição em amino-ácidos é mais ou menos igual nos diversos colágenos de diferentes animais, mas a porcentagem relativa de sua composição varia de animal para animal (4). A maioria dos colágenos mostra um alto teôr de glicina, hidroxiprolina e de ácidos aromáticos contendo enxôfre (5, 6).

Estudos de fibrilas colágenas por métodos físicos, tais como difração de raios X, com ângulo alto e baixo, microscopia eletrônica e microscopia de polarização, evidenciaram a natureza fibrosa do colágeno e mostraram a existência de um periodo característico na média de 640 Å em colágeno de tôda série

* Secção de Vírus, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil.
** Secção de Microscopia Eletrônica, Universidade de S. Paulo, Brasil.
*** Depto. de Fisiologia Geral e Animal, Universidade de S. Paulo, Brasil.
**** Laboratório de Ofiologia, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil.
Recebido, para publicação, em 26.I.1955.

animal (7). O período de 640 A tem sido observado também em colágeno de animais fósseis, como, por exemplo, na prêsa desmineralizada de um mamute de 15.000 anos (4, 7). Por outro lado, a difração de raios X com ângulo alto, que revela pequenos interstícios na arquitetura molecular, mostra diferenças nos períodos dos diversos colágenos (8). De todos êsses métodos, a microscopia eletrônica fornece uma aproximação especial à estrutura ultrafina das fibrilas e a sua ordem nas células e nos tecidos pela visualização direta. Infelizmente, devido ao poder resolvente dos microscópios eletrônicos de apenas 10 Å, detalhes de arquitetura das cadeias de polipéptidos dentro das fibrilas ainda não podem ser observados.

Presentemente, há três objetivos principais nas pesquisas sôbre fibrilas colágenas:

1) a consideração da sua estrutura ultrafina, partindo do arranjo espacial das cadeias de polipéptidos formando as fibrilas, até a organização destas nas rêdes dos tecidos e dos tendões. Tais estudos estão sendo feitos intensivamente no momento, achando-se, porém, longe de completação (9, 10). A partir de tais estudos, tentativas sérias foram feitas no sentido de reconstruir modêlos das cadeias de polipéptidos nas fibrilas colágenas. Dêstes os mais prometedores no momento são os modêlos de Bear (4), Randall (11), Pauling (12) e Huggins (14), visto que o modêlo de Astbury provou não ser satisfatório (13).

2) o estudo das propriedades químicas das fibrilas colágenas, particularmente no que diz respeito aos melhoramentos da qualidade de couro (3, 15). O colágeno é importante não só como matéria prima para a fabricação de gelatina e cola, mas de maior importância ainda na fabricação de couro. A pele, ou cório, tem como componente principal (35%) uma rêde de fibrilas colágenas que lhe dá resistência e elasticidade. Afim de manter estas propriedades e para eliminar a desvantagem da putrefação, as fibrilas colágenas são tornadas insolúveis por reação com taninos e sais de crômio. Estas reações podem ser controladas por observações no microscópio eletrônico.

3) do ponto de vista biológico, o colágeno é uma proteína estrutural intimamente associada com a organização de tecidos e órgãos. Portanto, o conhecimento da estrutura normal das fibrilas colágenas de diversos tecidos e órgãos, sob diferentes condições físico-químicas, é o ponto inicial para a compreensão das alterações que ocorrem em tecidos normais, por exemplo, a histogênese de tecidos conjuntivos e o processo de envelhecimento, bem como de alterações patológicas, tais como as produzidas por colagênase na febre reumática ou na gangrena (16, 26).

No presente estudo é nosso intento apresentar algumas observações sôbre a microscopia eletrônica de fibrilas colágenas normais de vários tecidos de alguns animais, principalmente de répteis, e demonstrar a ação de certos fatores químicos e físicos sôbre a estrutura fibrilar. Pareceu-nos mais conveniente apresentar os métodos, materiais, resultados e a discussão juntamente em cada secção, do que em capitulos separados.

PERÍODO E ESTRUTURA ULTRA-FINA DAS FIBRILAS

Estudámos fibrilas colágenas associadas com as miofibrilas dos seguintes músculos: obliquo externo do sapo, *Bufo paracnemis;* do jacaré, *Cayman latirostris;* das serpentes, *Liophis miliaris* e *Constrictor constrictor amarali;* do pombo e do homem.

Da série dos répteis (serpentes, jacaré e lagarto *Tupinambis teguixin*) foi usado também colágeno dos seguintes músculos: hioglosso, rabo, lingua, temporal e coração. Observações foram feitas também em fibrilas colágenas de veias e do canal deferente das serpentes e do lagarto. Em adição, usámos tendões das patas dianteiras, do dorso e do rabo do rato albino e o tendão da glândula venenosa de *Bothrops alternata* e o seu homólogo na *Constrictor constrictor amarali*. As fibrilas foram preparadas, para microscopia eletrônica, pela técnica prèviamente descrita para a preparação de miofibrilas (35). Observações foram feitas em ambos os microscópios, no Siemens 100b e no microscópio eletrônico RCA, EMU. Medidas foram obtidas das micrografias eletrônicas ampliadas, feitas no microscópio eletrônico RCA, sendo os aumentos determinados dentro de 5% de êrro (17).

Em todos os casos, as fibrilas colágenas aparecem como filamentos únicos, às vêzes uma rêde ou em feixes, apresentando uma caracteristica estriação transversal, formada pela alternação de bandas escuras e claras denominadas respectivamente bandas *A* e *B* por Schmitt (18) e bandas *D* e *H* por Wolpers (19). As bandas escuras são regiões de alto poder dispersivo eletrônico, o que significa que têm maior densidade ou mais átomos por unidade de volume do que as bandas claras. Nas preparações sombreadas com metal, as bandas são nitidamente visiveis quando a direção do sombreamento é paralela, ou quási paralela, ao eixo longo da fibrila (fig. 1). Em tais preparações, onde o sombreamento está em ângulos retos ao eixo longo, as bandas não são nitidamente vistas nas fibrilas, mas os contôrnos da fibrila são visíveis na sombra. Em preparações não sombreadas, as bandas podem ser vistas sòmente quando as fibrilas estão bem limpas, isto é, quando a camada da substância básica, às vêzes

grudada às fibrilas, não encobre e obscurece as bandas. Pode ser visto claramente, na fig. 1, que a banda *A* é mais alta do que a *B*, dando assim à fibrila o aspecto de um fio de pérolas. Não obstante, esta aparência é, na verdade, devido à perda de água da fibrila, sendo que foi demonstrado, por meio de réplicas de fibrilas colágenas úmidas, que a superfície é uniformemente lisa. Parece, portanto, razoável presumir que a banda *B* possúi um teôr mais alto de água do que a banda *A* (20). Por coloração seletiva como os chamados corantes eletrônicos, isto é, ácido ósmico, ácido fosfotúngstico ou acetato de uranil, uma estrutura mais fina pode ser evidenciada em preparaçõe snão sombreadas. Quatro linhas escuras aparecem na banda *A* (a, b, c, d) e uma única linha na banda *B* (e). Sob certas condições, as linhas "b" e "e" podem aparecer divididas em duas linhas cada, dando, assim, um total de sete linhas (23). Em fibrilas sombreadas, nem todas as linhas se tornam visíveis. Contudo, devido ao fato de que as linhas "b" e "c" são de diâmetro largo, as mesmas se tornam proeminentes em fibrilas limpas sombreadas paralelamente ao eixo longo (Figs. 1, 2), dando a aparência de uma estriação transversal extra na banda *A*, tendo um período de 270 Å, o assim chamado intra-período de preparações sombreadas (27). A soma dos comprimentos das bandas *A* mais *B* dá em média 640 Å, concordando, assim, com o espaceamento característico das fibrilas colágenas sêcas, conforme foi revelado por difração de raios X com ângulo baixo (4). Em todas as nossas experiências usamos espécimes sombreados com metal; portanto, variações das sub-linhas não foram consideradas nêste estudo.

Na maior parte do trabalho prévio em microscopia de colágeno usou-se fixação com formol, visto que êste não altera a refração dupla intrinseca do colágeno e, por conseguinte, não muda o arranjo das cadeias de polipéptidos nas fibrilas (28). Visto que nossos estudos incluem uma variedade de colágenos, achamos conveniente determinar a influência de diversos fixadores, antes de iniciar a experiência definitiva. Desta maneira, o período e o diâmetro das fibrilas foram determinados após o uso de formol, de soluções de Zenker e de Bouin, bem como de material não fixado. Os resultados obtidos com o tendão da glândula salivar de *Constrictor* são apresentados na *Tabela 1*, onde se pode ver que o período é o mesmo nos materiais fixados e nos não fixados, mas que a gama dos diâmetros varia com o fixador. O aspecto das fibrilas, após tal tratamento, é apresentado nas Figuras 1 e 2. À base dêstes resultados, usámes material não fixado, ou fixámos com formol a 5%, nas experiências definitivas.

As observações finais das fibrilas colágenas normais incluiram medições do período e do diâmetro de um número de fibrilas tiradas de regiões diferentes de vários animais, e estudos sôbre a forma da fibrila em geral. Na *Tabela 2* são apresentadas medições do comprimento do período e do diâmetro de fibrilas de diversos órgãos de vários animais. Pode-se notar que, apesar de que o período varia levemente, entre os órgãos do mesmo animal ou de animal para animal, permanece uniformemente ao redor de 640 Å. confirmando a observação de Bear obtida por meio de difração com ângulo baixo (8). Os diâmetros apresentaram maior variabilidade. Nas fibrilas de certos órgãos, por exemplo. da língua do lagarto, os diâmetros são uniformes. Em outros, porém, como por exemplo do rabo do jacaré (Fig. 3), a gama dos diâmetros pode ser extensiva, nêste caso de 640 a 1400 Å. A constância do período, mais a variação no diâmetro da fibrila, foi tomada por Bear (4) como base para seu modêlo da fibrila colágena, para sustentar a opinião de que a fibrila é composta de unidades, as protofibrilas, cujos diâmetros são muitas vêzes menores do que aquêle da fibrila e cuja composição é a de poucas cadeias de péptidos, tudo alinhado de maneira a dar um período constante.

Acredita-se que a fibrila colágena é composta de uma série de anéis ôcos (27). e, de fato, micrografias eletrônicas de cortes transversais de tendões (9) têm sido apresentadas mostrando a sua aparência ôca. Estas observações não discordam de nenhum modo das observações feitas com o microscópio de polarização (28), indicando que as fibrilas colágenas possuem a bi-refringência intrínseca e a de forma, visto que as protofibrilas são localizadas sòmente na periferia. Randall (9) discorda da idéia de uma fibrila ôca, alegando que, se isto fôsse verdade, a fibrila deveria mostrar menor densidade do que de fato mostra. Como resultado dos presentes estudos, acreditamos que a fibrila é ôca, e entendemos com "ocosidade" a ausência de proteina ou outro material sólido e a presença de uma fase líquida no interior da fibrila. A fase liquida desaparece durante o processo de secagem na preparação da fibrila para o microscópio, deixando uma fibrila parcialmente achatada e com aparência de um colar de pérolas. Em cortes ultra-finos, as fibrilas aparecem ôcas devido à preservação da estrutura tridimensional e à perda de água durante a fixação. A forma geral da fibrila colágena é bem ilustrada numa série de fotografias tiradas do tendão da glândula venenosa posterior de *Bothrops* (Figs. 5 e 6). O tendão foi deixado em salina fisiológica a 4-6°C durante 6 semanas para maceração: em seguida, lavado e triturado em água destilada, dessecado e sombreado com crômio. Percebe-se que algumas das fibrilas se fendem longitudinalmente, mostrando na região da fenda uma série de anéis incompletos (5A, 6A). Em outros, a orientação do corte da fibrila é de maneira que se pode observar a

extremidade ôca e quebrada (5A). E, ainda em outros, as extremidades das fibrilas são achatadas (5B) ou franjadas (6B), sugerindo que o material interno foi retirado durante o processo de secagem. Se, como acreditamos à base destas preparações, a fibrila tem um interior liquido, ou semi-liquido, os comentários de Randall não são mais válidos. Uma evidência adicional da estrutura anelar da fibrila é a sua extensibilidade. Sob a ação de tensão ao longo da fibrila única (o tendão todo não pode ser muito extendido, pois se quebra fàcilmente) a fibrila aumenta em comprimento, principalmente por mudança do comprimento da faixa clara, com pouca ou nenhuma alteração na faixa escura. Se a tensão for suficiente, os anéis parecem separar-se, quebrando a fibrila em pequenas unidades comparáveis aos sarcômeros de miofibrilas. Êste processo pode ser observado de melhor maneira em fibrilas sob a tensão da película de parlódio quando esta última arrebenta dentro do microscópio eletrônico (compare Fig. 4 mostrando fibrilas tendinosas do rabo, não fixadas e sendo deformadas por tensão longitudinal devido à fratura da película), visto que a extensão de uma fibrila única por outros meios é extremamente difícil. Tais observações têm papel importante na visualização da disposição dos amino-ácidos nas cadeias polipeptídicas, visto que, para o colágeno, o modêlo da cadeia alfa-beta de ceratina não pode ser aplicado (4, 29).

AÇÃO DA ÁGUA QUENTE SÔBRE AS FIBRILAS

É bem conhecido que, sob ação prolongada de água quente, o colágeno se dissolve e se transforma em gelatina. Para o tendão existe uma temperatura caraterística de encolhimento, que depende do meio e do tratamento prévio do tendão (3). Para o tendão fresco em água, a temperatura é de 60° — 65° C. O tendão fresco, a esta temperatura, primeiramente sofre um encurtamento repentino acompanhado por um aumento no diâmetro e uma diminuição no período. Continuando o aquecimento, o tendão é lentamente dissolvido e toma uma estrutura amorfa, conforme foi indicado pela difração de raios X com ângulo baixo (3, 4). Extendemos êstes estudos e observámos as alterações em fibrilas únicas por meio do microscópio eletrônico, usando tendão de rabo de rato. As fibrilas únicas, após 2 minutos em água distilada a 60°C, diminuem no comprimento e no período e aumentam no diâmetro, indicando, assim, que as alterações macroscópicas acima mencionadas são o resultado de alterações no nível fibrilar (Fig. 10A). A 40°C, nenhuma alteração na estrutura das fibrilas podia ser observada (Fig. 10B). A 60°C, após 2 minutos, as extremidades das fibrilas começam a perder as suas formas. Após uma exposição mais demorada, as estrias começam a desaparecer, demonstrando que a perda do espa-

ceamento longitudinal caraterístico (revelado por difração de raios X com ângulo baixo) é acompanhada pela perda do período de 640 Å, pondo em evidência, dessa maneira, que os dois realmente são idênticos. Após exposição adicional, nesta temperatura, as fibrilas se dissolvem completamente. A 100°C, as alterações ocorrem com grande rapidez. Dentro de 2 minutos, as fibrilas são transformadas completamente em gelatina.

Nossos resultados obtidos com o tendão do rato concordam com os de Lelli (30) para o derma humana.

A ação da água quente pode ser interpretada como segue (4). As protofibrilas primeiramente são alteradas do estado ordenado, que normalmente ocorre na fibrila colágena intacta, para um estado desordenado. Com a prolongada exposição, a água quente altera as protofibrilas colágenas para moléculas livres de gelatina.

AÇÃO DA ÁCIDO ACÉTICO SÔBRE O TENDÃO

Há anos, Nageotte (31) mostrou que o tendão do rabo de rato podia ser dissolvido em ácido acético diluido (10^{-4} molar), produzindo uma solução clara e muito viscosa. Esta observação foi extendida aos colágenos de diversas origens animais (compare Bear para referências) (4). O colágeno pode ser reprecipitado a partir da solução viscosa alterando-se a concentração salina por meios de diálise, ou diluindo-se com tampões adequados de pH definido (32, 34). O colágeno reprecipitado apresenta a mesma estrutura que o original, conforme demonstra a difração de raios X (33), i.e., o espaceamento de 640 Å, mas tem uma ordem interna menos regular. A compreensão do mecanismo da reprecipitação do colágeno a partir do estado solúvel, bem como o da reação de soluções colágenas com mucoproteinas (34), polisacáridos, glucoproteinas e derivados do ácido nucléico (7), que também produzem precipitados formados de fibrilas com períodos, é de maior importância para a obtenção de informações sôbre o mecanismo da fibrogênese em tecidos.

Visto que as descrições na literatura das condições exatas para a dissolução e a reprecipitação do colágeno são incompletas (32), repetimos estas experiências com diversos tipos de colágeno de vários animais, variando a temperatura, a molaridade do ácido acético, o pH e a concentração iônica. Determinámos, desta maneira, as condições definidas necessárias para a precipitação de certos colágenos e descobrimos que alguns não se dissolvem, ou então se dissolvem com dificuldade, e que a temperatura desempenha papel importante no processo.

A. Tendão do rabo de rato. — Quando o tendão do rabo de rato é colocado, sob condições estéreis, em qualquer volume de ácido acético molar 10^{-4}, em frascos tampados, a 4-5°, ou a 37°C, sòmente uma pequena fracção do tendão é dissolvida. Alterações macroscópicas, porém, podem ser observadas, variando conforme a temperatura. Após esforços repetidos, conseguimos obter melhor dissolução do que 95%, congelando, primeiramente, o tendão com gêlo sêco, cortando-o, por meio de um micrótomo, em secções de espessura de 30-40 micra e colocando-o, finalmente, no ácido acético a 37° durante 6 horas, em condições estéreis. A entrada em solução foi favorecida por agitações periódicas, com pérolas de vidro. Repetindo o processo sem fazer os cortes, obtivemos igualmente bons resultados. Desta maneira, o congelamento prévio, de algum modo, permite uma dissolução mais fácil, talvez por ação sôbre a substância básica (ground substance) que envolve o colágeno. O tendão congelado não se dissolveu a 4-5°C. As quantidades relativas do tendão e do ácido acético não são críticas. Nas experiências finais usámos uma proporção de uma parte de tendão úmido a cinco partes de ácido acético a 10^{-4} molar, visto que proporções mais altas produzem soluções demasiadamente viscosas para serem filtradas no filtro de Seitz. A solução viscosa de colágeno assim produzida foi filtrada num filtro de Seitz, afim de eliminar qualquer material suspenso ou quaisquer fibrilas não dissolvidas e examinado o filtrado no microscópio eletrônico. Nenhuma estrutura fibrilar podia ser encontrada na solução final.

O processo de reprecipitação dependeu em grande parte da temperatura. Os melhores precipitados foram produzidos, usando-se uma parte de solução de colágeno para cinco partes de tampão de ácido cítrico-citrado de sódio a 0,1 M por volume, a pH 4,9. A 4-5°C, não se pode observar precipitado na mistura de tampão e colágeno nem após uma semana. Centrifugação a baixa velocidade (Servall, 5000 rpm, 2 horas) não separou qualquer precipitado fibrilar observável. Quando, porém, a solução de colágeno e a do tampão, ambos prèviamente colocados à temperatura do ambiente, são misturados e deixados em temperatura do ambiente, uma precipitação completa se forma dentro de duas horas. Êste precipitado branco, gelatinoso, pode ser fàcilmente separado do líquido sobrenadante por meio de decantação ou por centrifugação. Para o exame no microscópio eletrônico, os sais foram retirados por repetidas lavagens com água destilada e recentrifugação. O precipitado final, suspenso em água distilada, em seguida foi examinado de maneira usual. Achou-se um conteudo de fibrilas colágenas carateristicas do mesmo período como aquelas nas fibrilas originais. Em geral, as fibrilas reprecipitadas mostraram contornos nítidos, mas as extremidades apareceram um tanto franjadas. Em várias preparações apareceram diversos tipos de fibrilas, variando de fibrilas curtas, não estriadas (Fig. 7A), a fibrilas mais compridas, não estriadas (Fig. 7B), fibrilas

mais compridas estriadas (Fig. 8) e, finalmente, fibrilas definitivas (Fig. 9). É uma tentação sugerir que estas representam fases na formação da fibrila colágena estriada, i.e., que a estriação transversal ocorre sòmente depois que a fibrila alcança um certo comprimento e possivelmente uma certa tensão.

B. Tendão da glândula salivar. — Tentativas para repetir a experiência acima, com o tendão posterior das glândulas labiais da *Constrictor constrictor*, falharam, quando foram usados tempos de contacto mais prolongados. Esta diferença no comportamento é inexplicável, uma vez que ambos os tendões, o do rabo do rato e o da glândula, são tendões livres de outros tecidos. O tendão da glândula mostrou um certo grau de inchamento após o tratamento de 24 horas com o ácido acético. Fibrilas fixadas em formol a 5%, trituradas em água distilada e examinadas de maneira usual no microscópio eletrônico, mostraram um aumento no período de estrias transversais, com diminuição na nitidez dos seus contôrnos.

C. Tendões de várias partes do corpo. — As duas experiências prévias sugeriram fortemente que o poder dissolvente do ácido acético depende do animal, da região do corpo de onde o tendão é tirado e do pre-tratamento. Sem congelamento prévio do tendão, a ação do ácido acético parece estar limitada ao inchamento, cujo grau e tipo dependem da temperatura.

Para provar esta tese, tendões foram tirados do rabo, do dorso e das patas de ratos albinos. Pedaços de aproximadamente o mesmo tamanho de cada região foram colocados, sem congelamento prévio, em ácido acético a 10^{-4} molar, sob condições estéreis, a 4° e 37° C, e foram assim mantidos durante 24 horas. Subseqüentemente foram fixados em formol a 5%, triturados em água destilada e preparados para o microscópio eletrônico. Em um grupo das experiências, o ácido acético foi colocado à temperatura desejada antes de adicionar o tendão. Numa segunda série, os tendões foram colocados no ácido acético a temperatura ambiente e em seguida ajustado às temperaturas desejadas. Os resultados diferiram consideràvelmente, como será demonstrado abaixo.

Na temperatura mais baixa (4°C), os tendões incham surpreendentemente e ficam transparentes, tendo a aparência de uma geléia rigida, e os tendões não perdem a sua forma nem após agitação (Fig. 11). A 37°C, de outro lado, o tendão incha menos, fica opaco e perde a sua aparência sedosa. As fibrilas dos tendões levadas gradualmente de 37° a 4°, apareceram, no microscópio eletrônico, como fibrilas em *zig-zag*, de período curto e irregular (Fig. 12). Êste fenômeno foi visto principalmente nos tendões do rabo e do dorso. Em algumas das fibrilas, em *zig-zag*, o período foi mantido, em outras desapareceu. Não foram observadas fibrilas, em *zig-zag* a 37°C.

O significado da formação do tipo *zig-zag* irregular de fibrila não fica esclarecido por êstes estudos. Parece estar relacionado com o efeito da tem-

peratura na mesma, uma vez que os tendões colocados diretamente em ácido acético prèviamente resfriado a 4°C, não mostram a formação de *zig-zag*. Assim, é evidente que é causada pelo decréscimo gradual da temperatura. Notável era também o fato de que sòmente à temperatura baixà perderam-se as estrias transversais, enquanto à temperatura mais alta as estrias continuaram observáveis, mesmo quando a fibrila aparentemente se estava desintegrando ao longo do eixo longitudinal. De fato, o aspecto das fibrilas após o tratamento com ácido acético a 37°C é semelhante àquele após o tratamento com água a 60°C.

AÇÃO DE ÁLCALE DILUIDO SÔBRE O TENDÃO

Outrora se acreditava que álcale diluido não ataca o colágeno. Não obstante, Gross (16) mostrou que uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 N causa uma fragmentação das fibrilas colágenas na direção transversal e, eventualmente, a redução de algumas fibrilas a massa amorfa. Tentativas de repetir as experiências de Gross, com o tendão das glândulas labiais de *C. constrictor*, não tiveram sucesso. As fibrilas colágenas foram isoladas, como prèviamente descrito, e suspensas em solução de hidróxido de sódio a 10^{-4}N. Testemunhos foram feitos por suspender outros tendões em água destilada. Deixaram-se ambos a 37°C e a 0°C durante 24 horas e em seguida examinaram-se no microscópio eletrônio. Quanto podia ser determinado pela micrografias, não houve alterações. Estas experiências mostram, pois, que (1) o álcale não tem efeito sôbre o tendão, como prèviamente se acreditava, ou (2) que, como se encontra em outras experiências acima mencionadas, o efeito de um agente sôbre o colágeno depende em grande parte do animal e da região de onde o tendão é tirado. Para o esclarecimento dêste ponto, novos trabalhos experimentais estão em andamento.

RESUMO

Fibrilas colágenas de vários órgãos do sapo, de répteis, do pombo, do rato e do homem, foram estudadas, com auxílio do microscópio eletrônico. Observações foram feitas sôbre a influência de extensão, de fixadores, sais, ácidos, álcales e de temperatura sôbre a estrutura da fibrila. Igualmente, foram estudadas as condições necessárias para a dissolução e reprecipitação de colágeno.

As fibrilas normais de vários órgãos de diversos animais mostraram um período idêntico, mas variaram consideràvelmente nos diâmetros. A variação

era mais acentuada em certos animais e órgãos do que em outros; por exemplo, as fibrilas da língua do lagarto eram extremamente uniformes, enquanto aquelas do rabo do jacaré variavam muito.

As fibrilas foram observadas em estado fresco ou fixadas em formol, ou nos líquidos de Bouin e de Zenker. Em todos os casos, o período permaneceu uniforme, mas o diâmetro das fibrilas pareceu variar com o fixador. A maior uniformidade foi obtida com formol a 5%.

Quando sujeita a tensão, a fibrila aumenta no comprimento, principalmente na faixa clara. Com tensão contínua, a fibrila parte-se em unidades individuais com comprimento de apenas duas faixas.

Tendões expostos a salina fisiológica por longos períodos de tempo, fendem-se fàcilmente em direção longitudinal, durante a *trituração*, e mostram um achatamento considerável quando secados nas grades. Em muitas fibrilas assim tratadas podem ser vistos anéis incompletos na periferia da fibrila, ou um interior ôco nas extremidades. Acreditamos, porisso, que a fibrila, normalmente, possúi um interior líquido, ou semi-líquido.

A 40°C, as fibrilas não mostram alterações em água. Dentro de 2 minutos de exposição à água a 60°C, as fibrilas começam a perder a sua forma. Continuando a exposição, as fibrilas ficam mais curtas, aumentam no diâmetro, com encurtamento conseqüente do período, dissolvem-se lentamente e se transformam, finalmente, em massa gelatinosa, amorfa. A 100°C, estas alterações ocorrem dentro de 2 minutos. A água quente parece alterar as protofibrilas colágenas a moléculas livres de gelatina, passando a fases nas quais as protofibrilas são alteradas do estado ordenado a um estado desordenado.

A temperatura desempenha papel importante na dissolução e na reprecipitação das fibrilas. Um congelamento prévio dos tendões era necessário para causar sua dissolução no ácido acético. A 4-5°, a dissolução é extremamente lenta; a 37°C, bem rápida. A 4-5°, a reprecipitação não ocorre dentro de uma semana, enquanto a 37°C é completa dentro de 2 horas.

Fibrilas dissolvidas em ácido acético e reprecipitadas em tampão de citrato mostraram diversas fases de reformação. Acredita-se que a sequência é (1) fibrilas curtas, não estriadas, (2) fibrilas compridas, não estriadas, (3) fibrilas compridos, estriadas. Desta maneira, parece que um certo comprimento da fibrila e uma certa tensão são necessários para a formação das estrias nas fibrilas reprecipitadas.

Tendões do rabo, do dorso e das patas do rato branco mostraram diferentes respostas ao mesmo tratamento. Tentativas de dissolver e reprecipitar o tendão posterior das glândulas labiais de *Constrictor constrictor*, não foram bem sucedidas. Desta maneira, achamos que as condições necessárias para a dissolução

e a reprecipitação de fibrilas colágenas variam com o animal e o órgão de origem.

Tendões não prèviamente congelados, quando adicionados a ácido acético prèviamente resfriado a 4°C, incham e ficam transparentes, mas permanecem lineares em forma. Aquêles colocados em ácido acético a 37°C e em seguida resfriados a 4°C, mostram uma forma de *zig-zag*. A 37°C, não são formados *zig--zags*.

Álcale diluido pareceu não ter efeito sôbre o tendão de *Constrictor constrictor*, nem a 4° nem a 37°C.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o auxílio técnico de Sr. Adolpho Brunner, Jr. e Srta. Cecilia Doneux. O trabalho foi favorecido, em parte, por subsídios da Fundação de Rockefeller e do Conselho Nacional de Pesquisas.

TABELA I

INFLUÊNCIA DE VARIOS FIXADORES SÔBRE O TENDÃO DA GLANDULA DE VENENO DA SERPENTE.

Fixador	Não-fixado	Formol 5%	Bouin	Zenker
Período (Å)	660	660	660	660
Comprimento (A)	1000-1600	1400-2000	830-2600	1100-1300

TABELA II

PERÍODOS E DIÂMETROS DE FIBRILAS COLÁGENAS DE VÁRIOS ANIMAIS (em Å)

Orgão / animal	Serpente	Lagarto	Jacaré	Sapo	Pombo	Ser Humano
Obliquo externo				d=798 p=630	d=798 p=600	d=798 p=570
Coração	d=1100 p=600					
Temporalis	d=630 p=590					
Hioglosso	d=600 p=600	d=640-900 p=640				
Tendão da glandula de veneno	d=1400-2000 p=660					
Veia	d=800 p=630					
Vas deferens	d=630 p=600					
Retrator do hemipenis	d=900 p=600					
Cauda			d=640-1400 p=640			
Lingua		d=600 p=590				

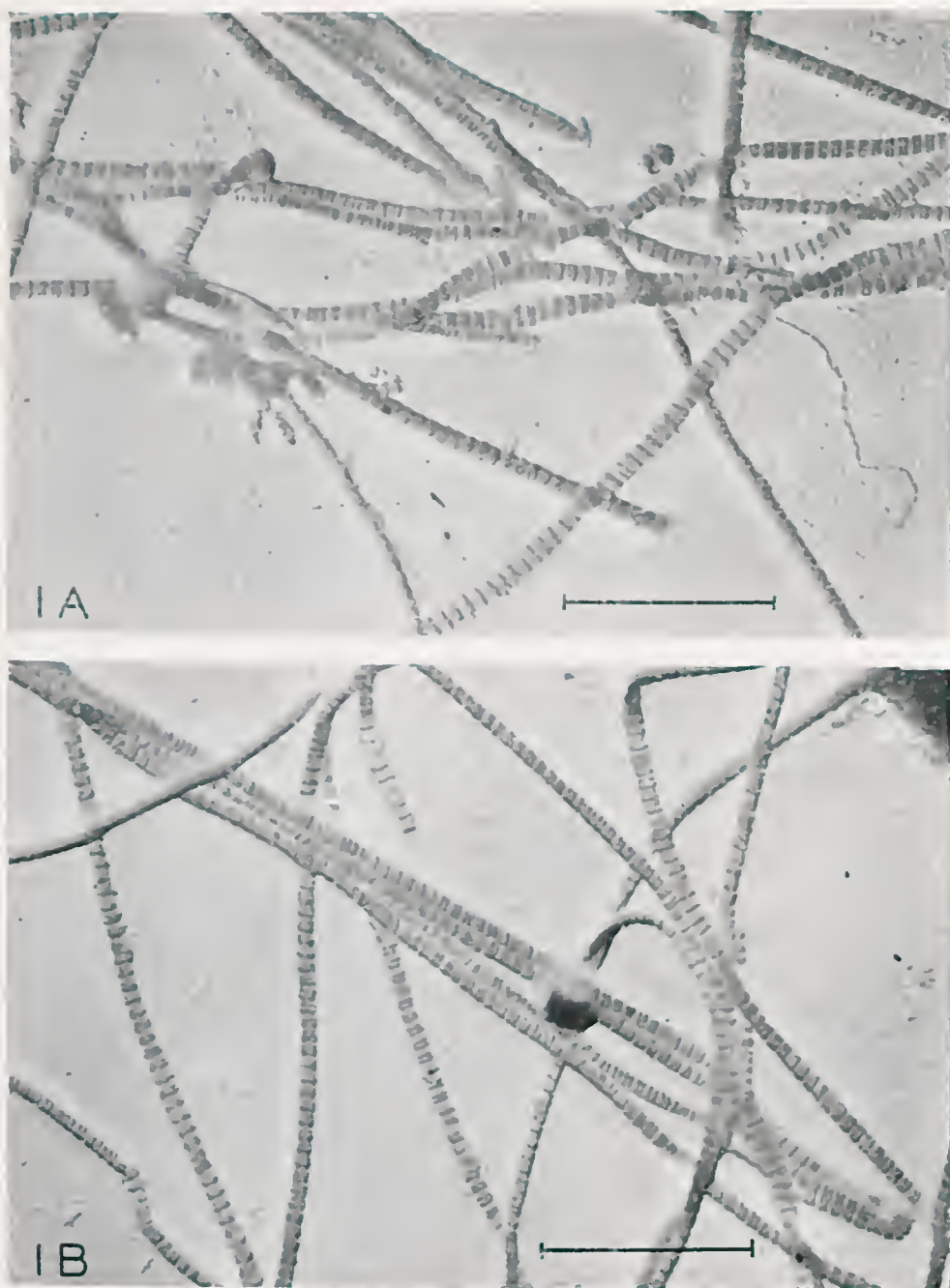



Fig. 1 A, B. — Fibrilas colágenas normais do retrator do hemipenis de *Constrictor constrictor amarali*. Fixadas em formol.

Fig. 1 A, B. — Normal collagen fibrils from retractor of hemipenis of *Constrictor constrictor amarali*. Formalin fixed.

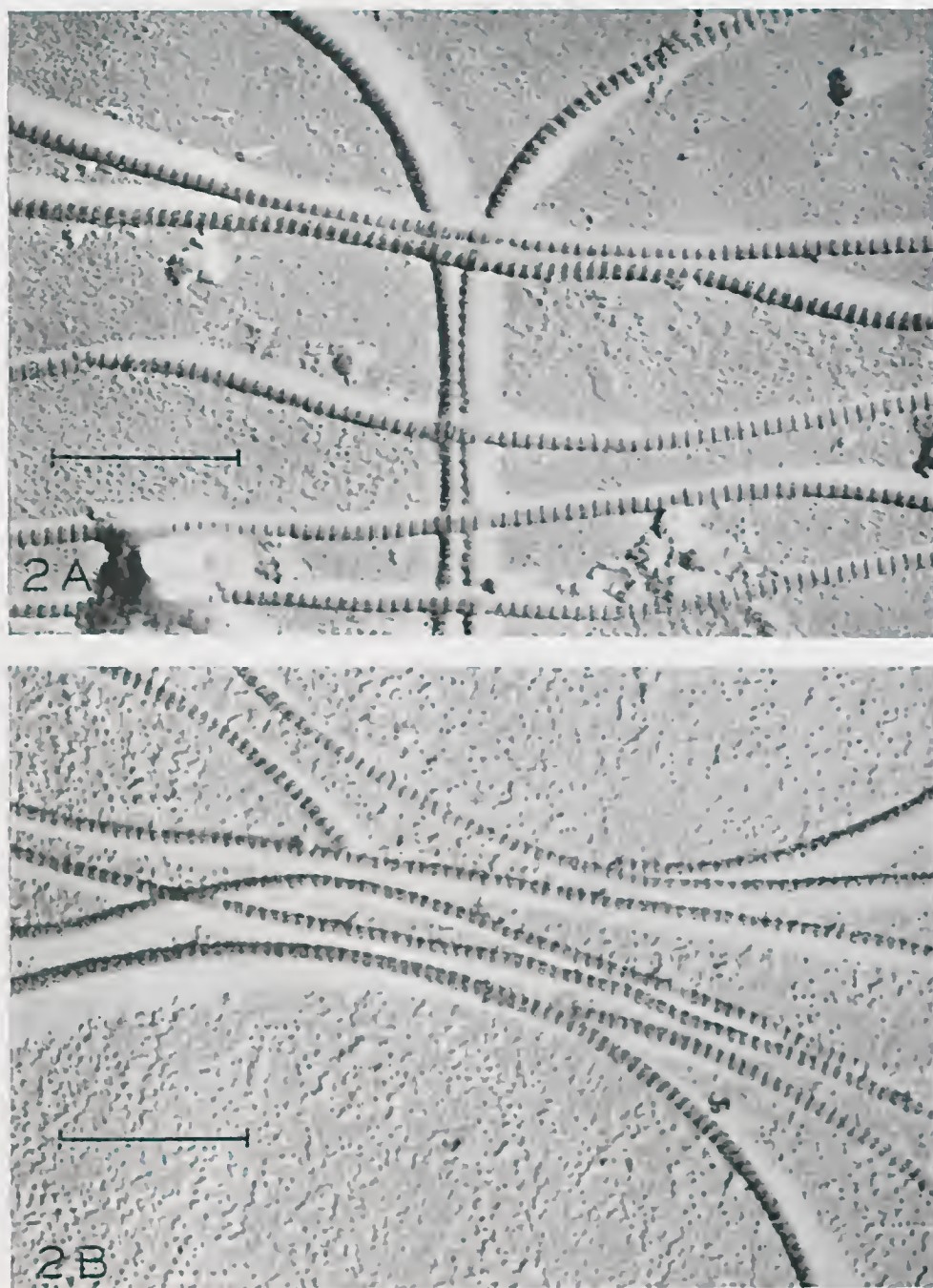



Fig. 2. — A. Fibrilas colágenas normais do retractor do hemipenis de *Constrictor*, fixadas no liquido de Zenker. — B. Fibrilas colágenas normais do retractor do hemipenis de *Constrictor*, fixadas no liquido de Bouin.

Fig. 2 — A. Normal collagen fibrils from *Constrictor* hemipenis retractor, fixed in Zenker's fluid. — B. Normal collagen fibrils from *Constrictor* hemipenis retractor, fixed in Bouin's fluid.

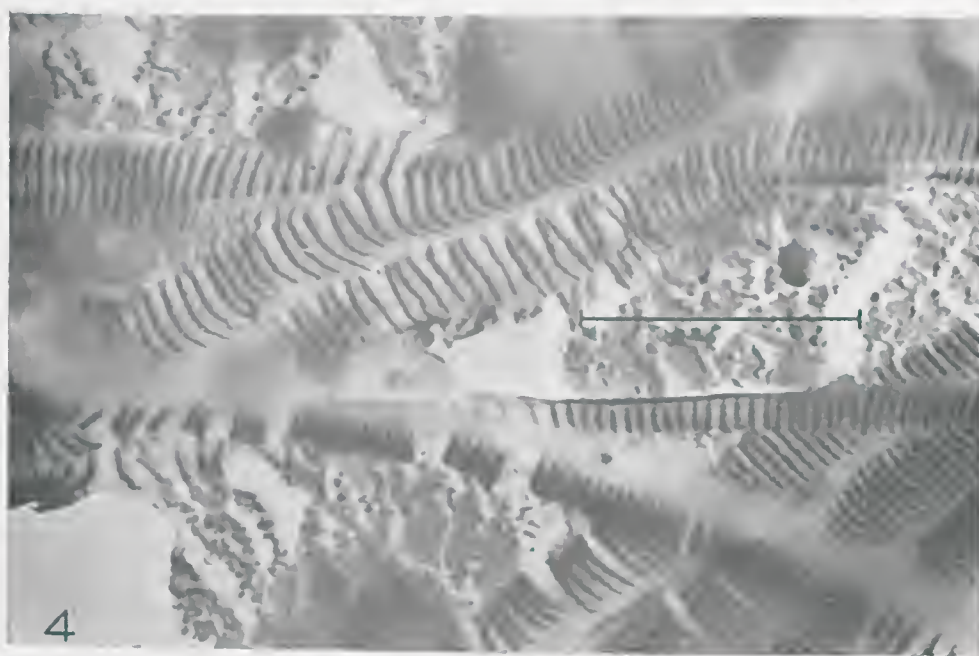
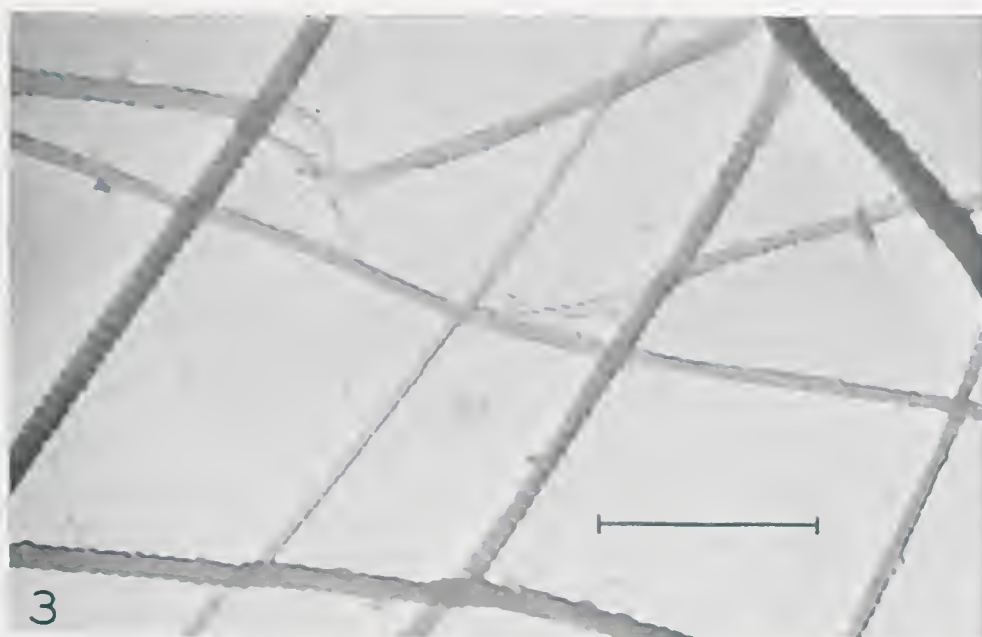



FIG. 3 — Fibrilas colágenas do rabo de jacaré, mostrando variação no diâmetro.
FIG. 4 — Fibrilas colágenas do tendão dorsal do rato, mostrando a influência de extensão. Não fixadas.

FIG. 3. — Collagen fibrils from tail of caiman, showing variation in diameter.
FIG. 4. — Collagen fibrils from dorsal tendon of rat, showing influence of stretch. Unfixed.

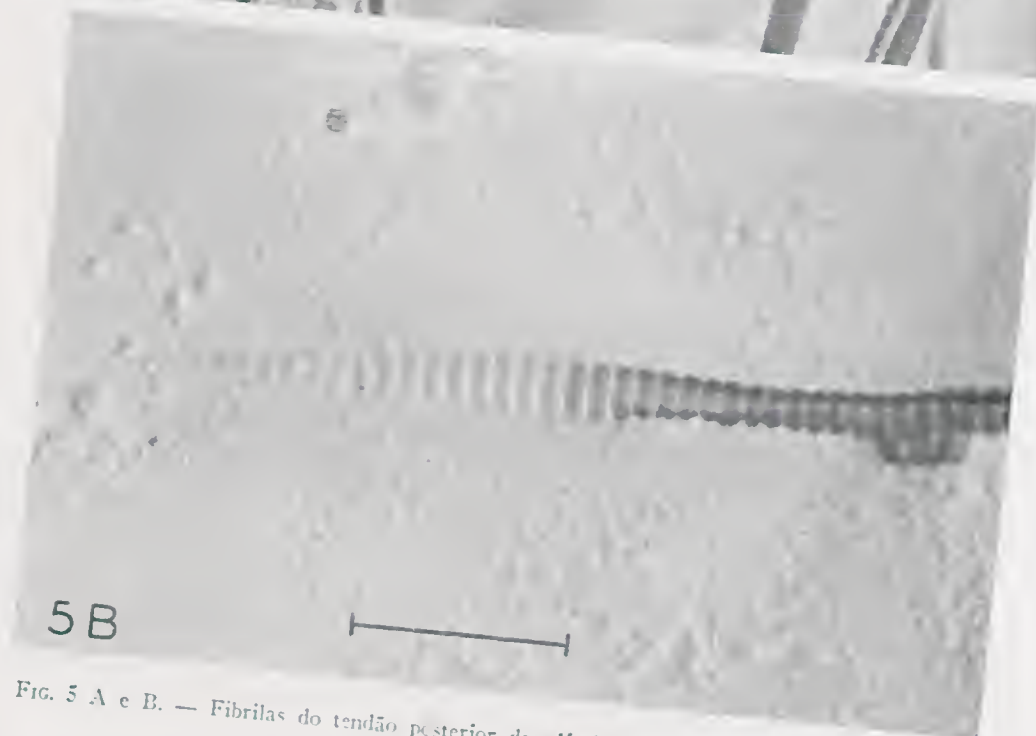
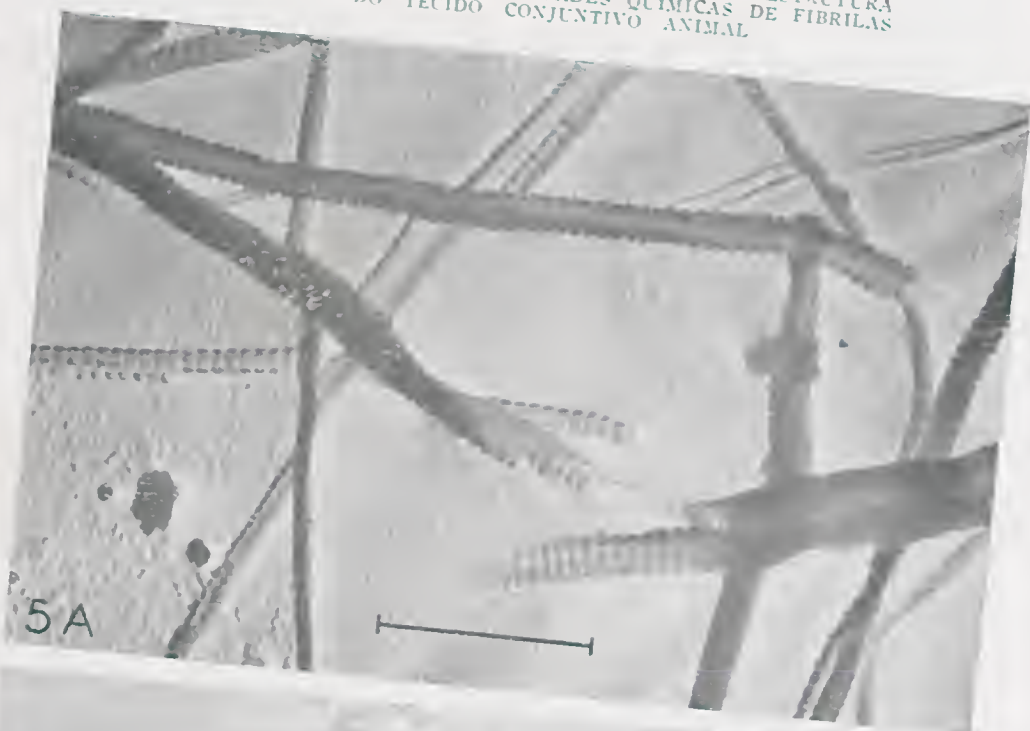



FIG. 5 A e B. — Fibrilas do tendão posterior da glândula venenosa de *Bothrops alternata* após 1 1/2 meses em salina a 4-5°C.

FIG. 5 A and B. — Fibrils from posterior tendon of poison gland of *Bothrops alternata* after 1 1/2 months in saline at 4-5.° C.

SciELO

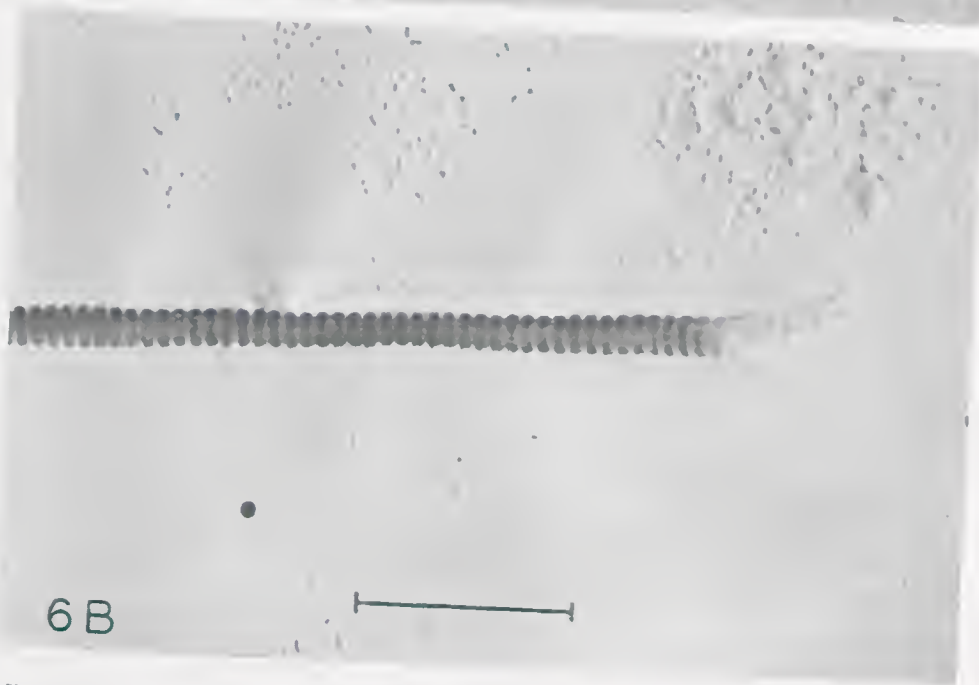
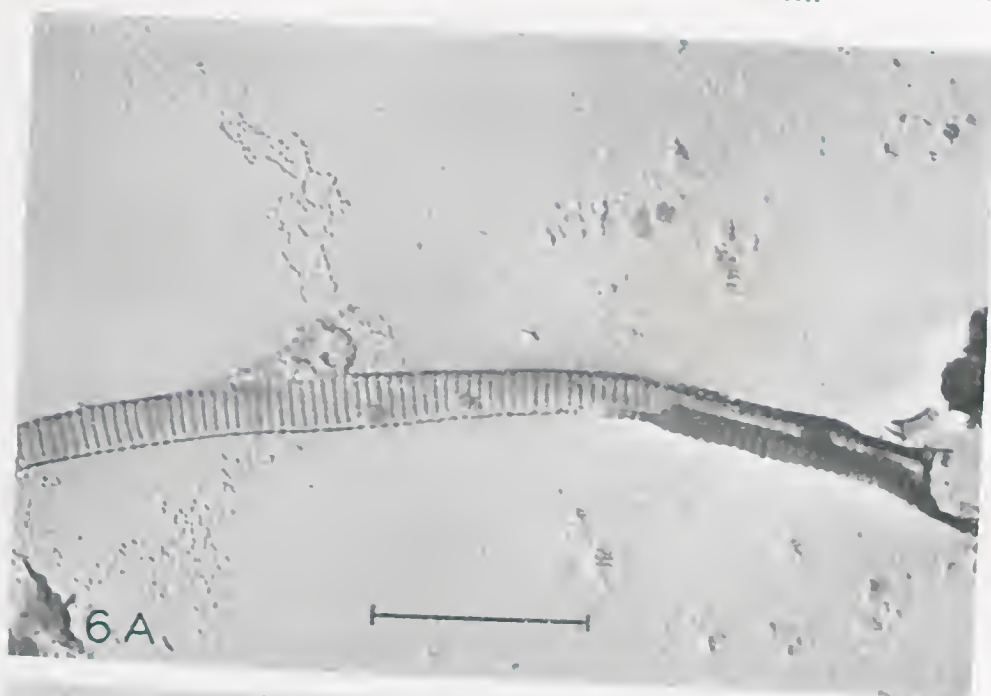



FIG. 6 A e B. — Fibrilas do tendão posterior da glandula venenosa de *Bothrops alternata* após 1 1/2 meses em salina a 4-5°C.

FIG. 6 A and B. — Fibrils from posterior tendon of poison gland of *Bothrops alternata* after 1 1/2 months in saline at 4-5°C.

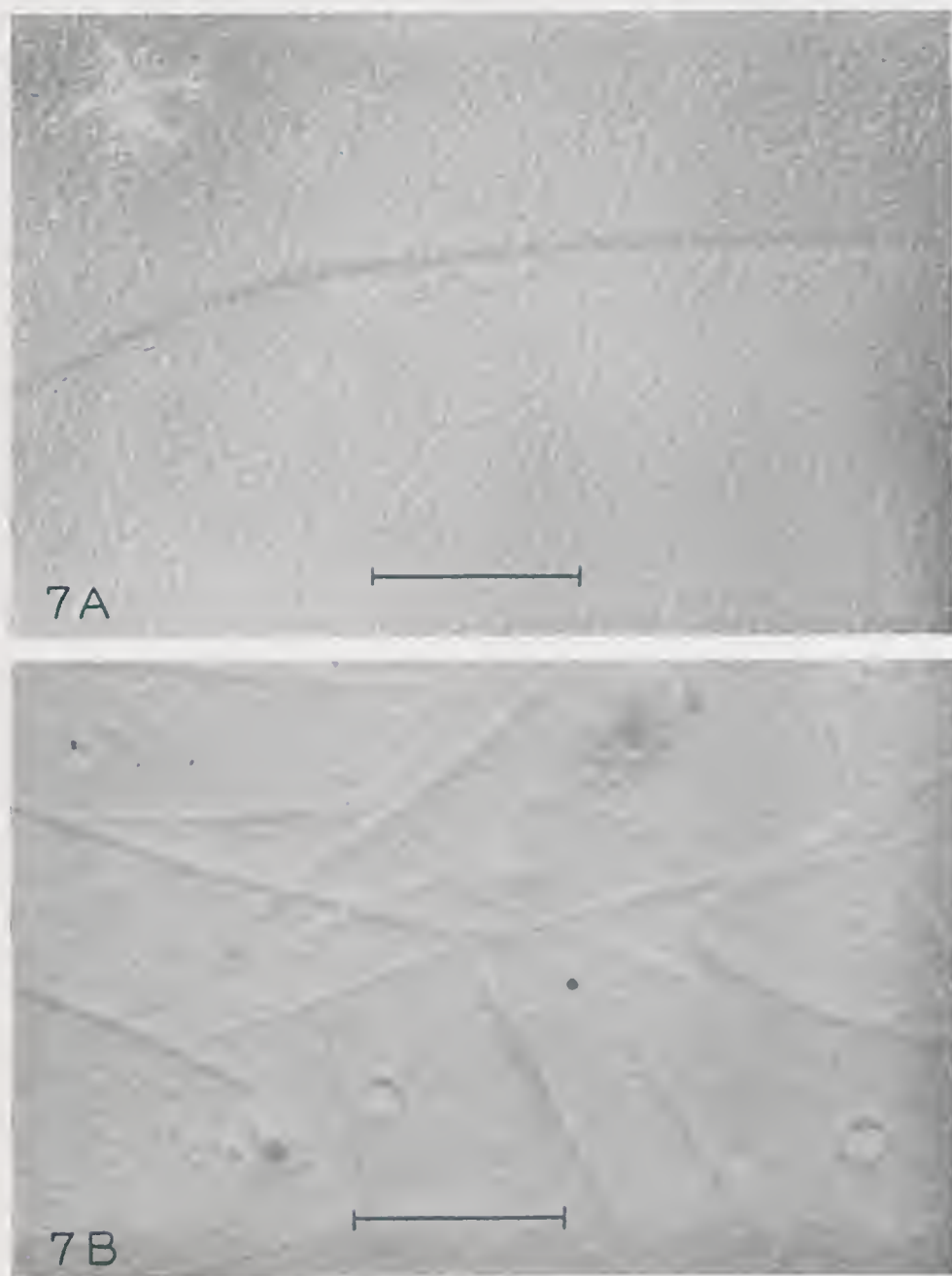



FIG. 7. — A. Fase inicial na formação de fibrilas reprecipitadas; na maioria fibrilas curtas, não estriadas. — B. Fase mais adiantada, mostrando fibrilas mais compridas, não estriadas.

FIG. 7 — A. Early stage in formation of reprecipitated fibrils; mostly short, non-striated fibrils. — B. Later stage showing longer, non-striated fibrils.

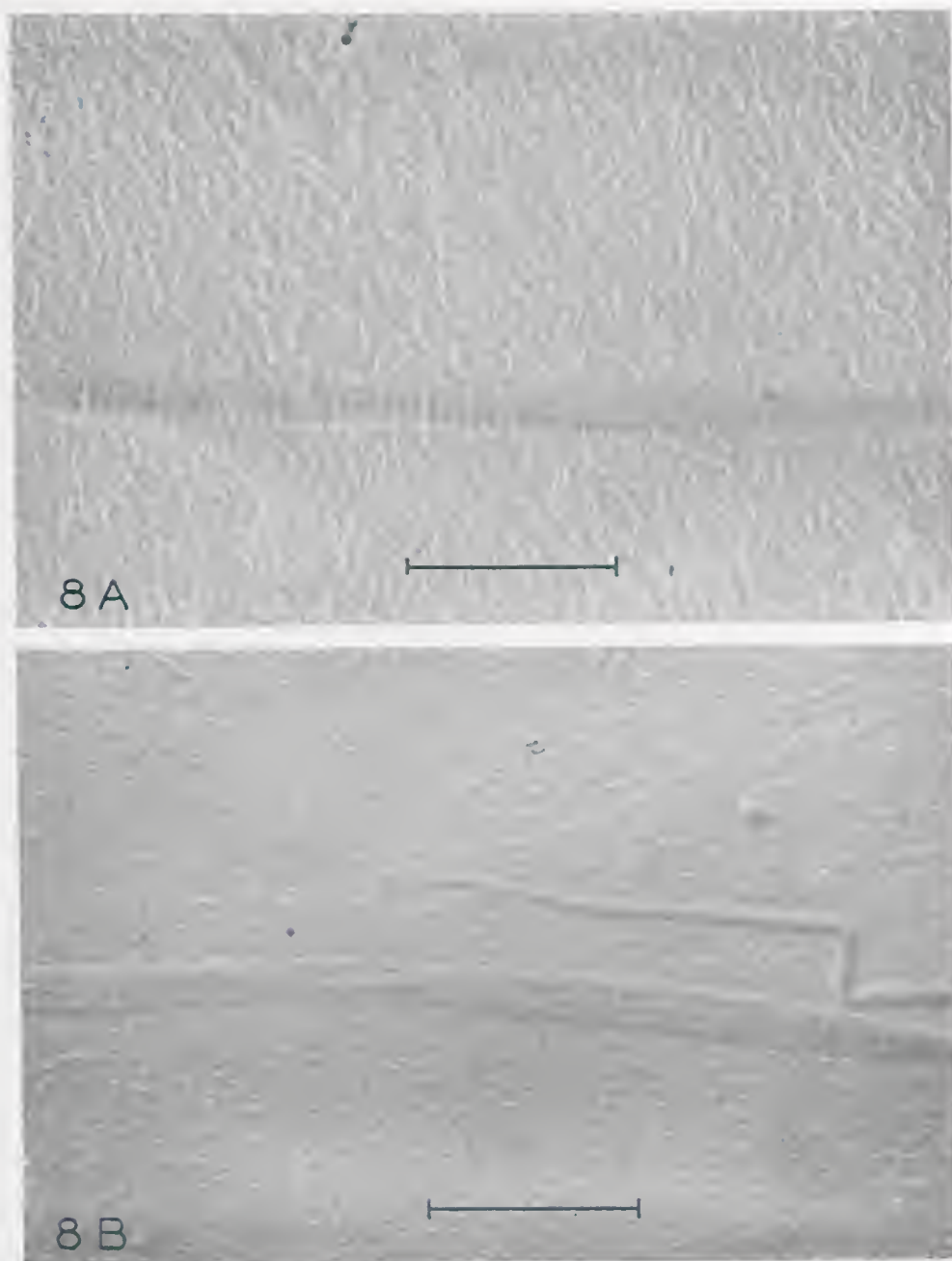



Fig. 8 A e B. — Fases intermediárias da formação de fibrilas reprecipitadas, mostrando algumas fibrilas compridas, estriadas.

Fig. 8 — A and B. — Intermediate stages of formation of reprecipitated fibrils, showing several, long, striated fibrils.

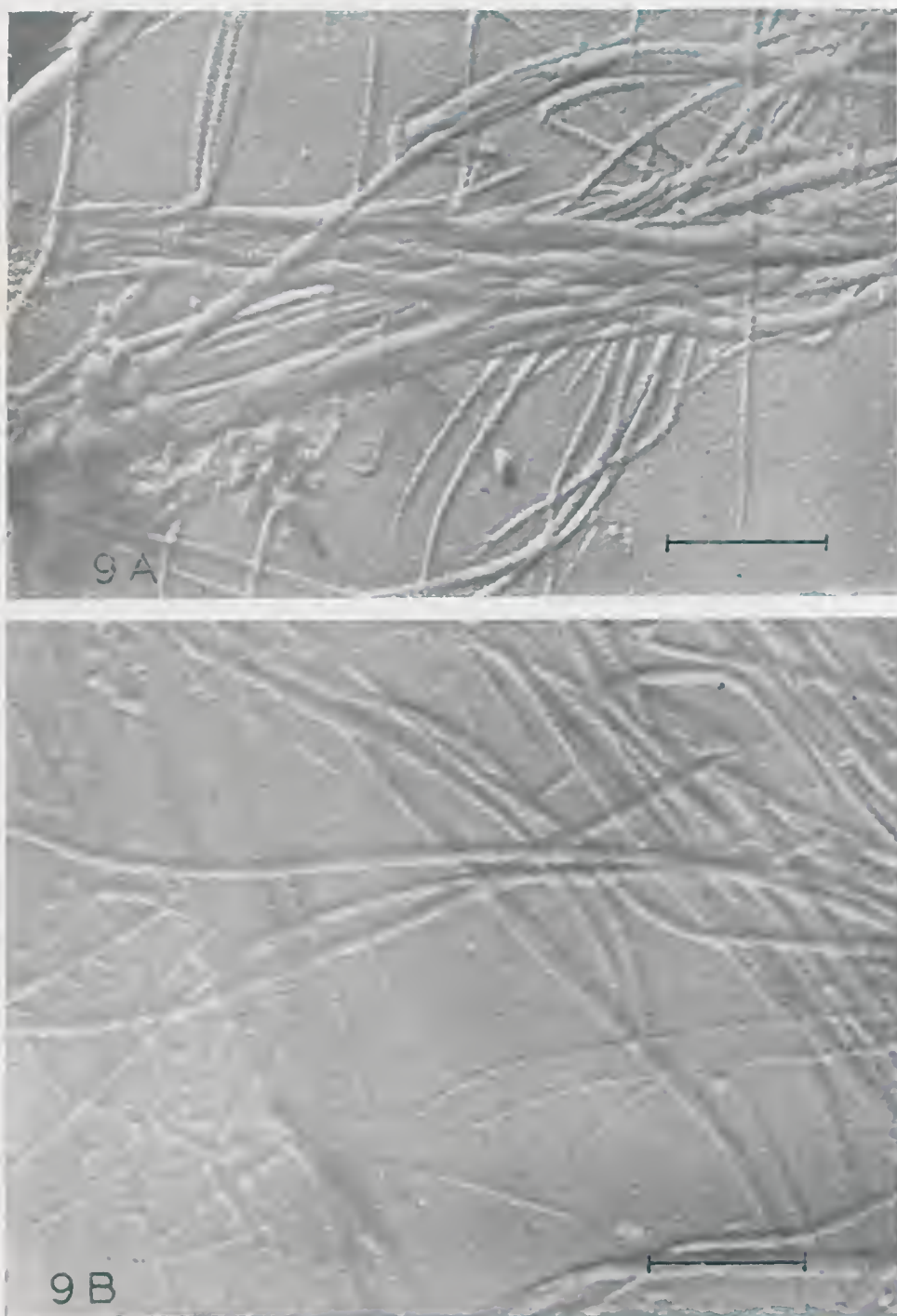



Fig. 9 A e B. — Fases finais na formação de fibrilas reprecipitadas; essencialmente fibrilas todas compridas, estriadas, possuindo período igual àquele das fibrilas originais antes do tratamento.

Fig. 9 — A and B — Final stages in formation of reprecipitated fibrils: essentially all long, striated fibrils, having period equal to that of the original fibrils before treatment.

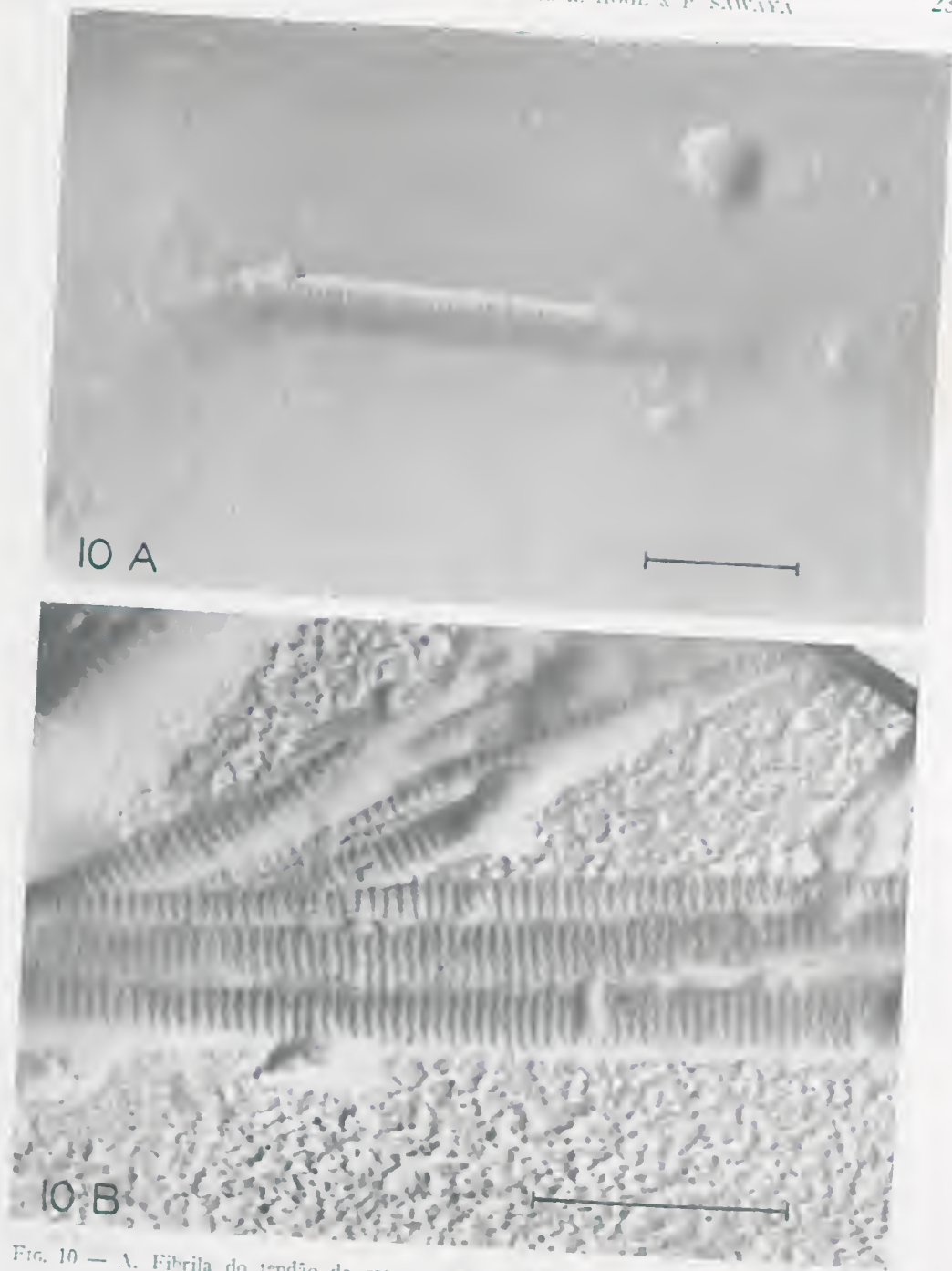



FIG. 10 — A. Fibrila do tendão do rato exposta a 60° C durante 2 minutos.
B. Fibrila do tendão do rato exposta a 40° C durante 2 minutos.

FIG. 10 — A. Fibril from rat tendon exposed to 60° C for 2 minutes.
B. Fibril from rat tendon exposed to 40° C for 2 minutes.

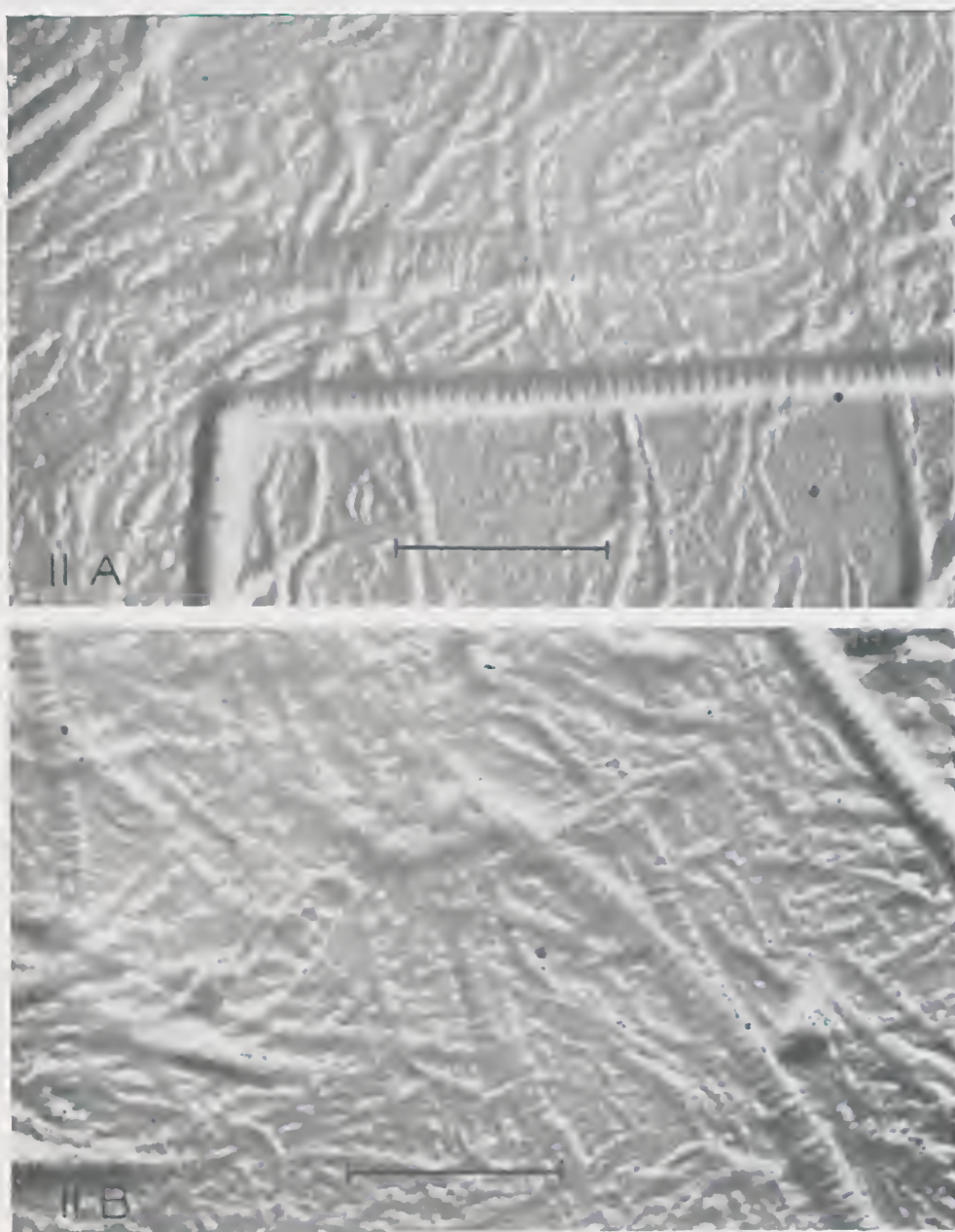



FIG. 11 A e B. — Fibrilas do tendão posterior da glândula labial de *Constrictor* após exposição do ácido acético a 10-4 M prèviamente resfriado a 4-5°C durante 24 horas.

FIG. 11 — A and B. — Fibrils from posterior tendon of labial gland of *Constrictor* after exposure to precooled 10-4 molar acetic acid at 4-5.° C for 24 hours.

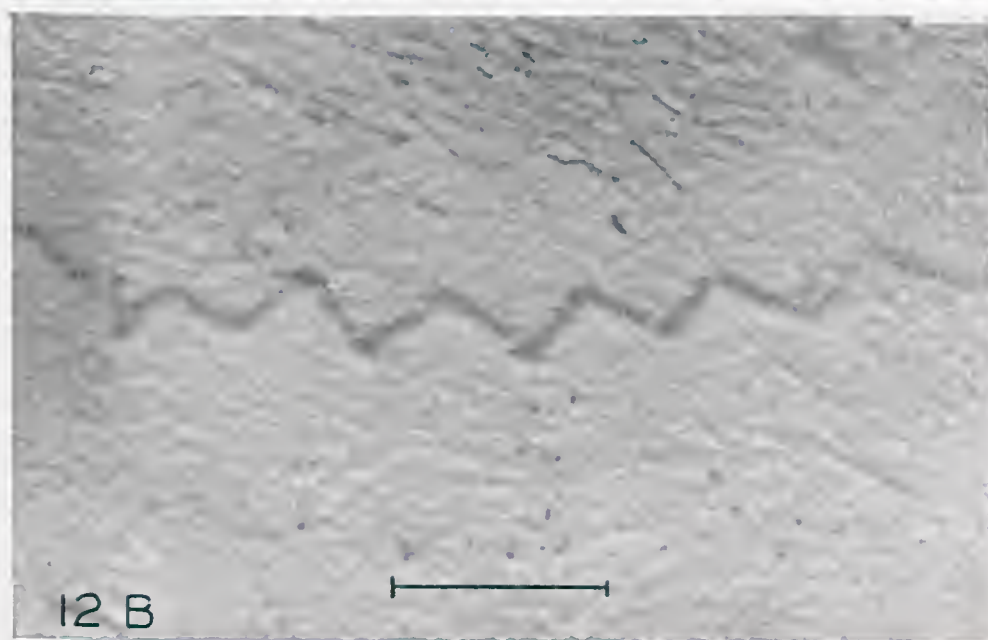
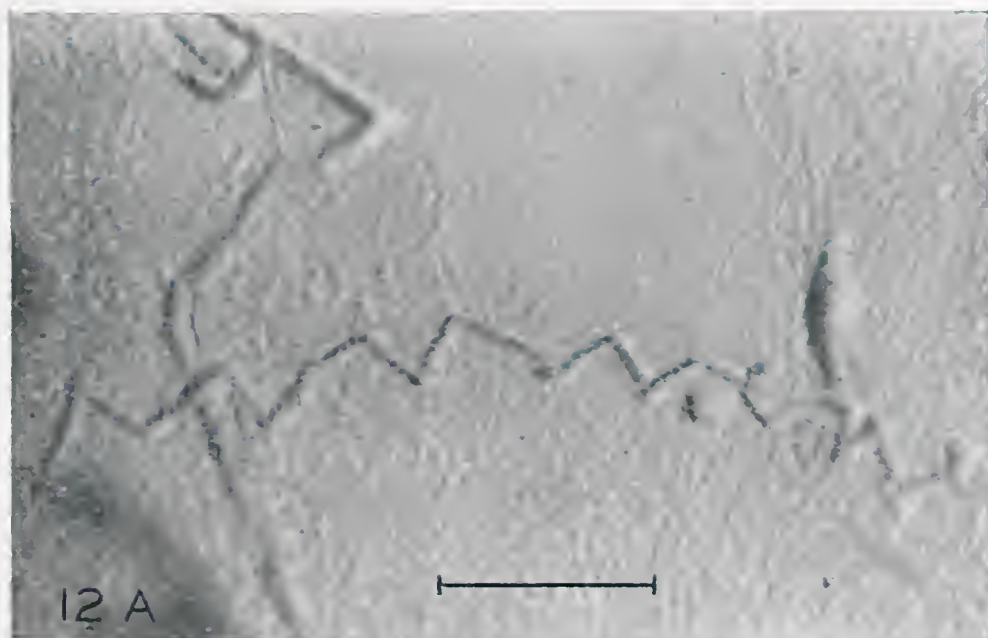



Fig. 12 A e B. — Fibrilas do dorso do rato depois de levados gradualmente, em ácido acético, de 37° a 4°C.

Fig. 12 — A and B. — Fibrils from dorsum of rat after being dropped gradually from 37.° to 4.° C in acetic acid.

A CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE FINE STRUCTURE AND CHEMICAL PROPERTIES OF ANIMAL CONNECTIVE TISSUE FIBRILS.

P. SOUZA SANTOS*; H. SOUZA SANTOS**; G. A. EDWARDS***; A. R. HOGE****
AND P. SAWAYA***.

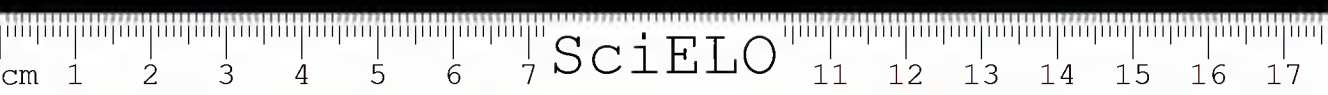
INTRODUCTION.

Collagen is the principal protein constituent of the loose and compact connective tissues. It occurs either as a network of fibrils of approximately one micron thickness and of many microns length associated with almost all tissues in the whole animal series; or as thick bundles forming the tendons (1). Collagen is a fibrous protein, according to the classification of Astbury (2). It is insoluble in water, organic solvents, and dilute solutions of alkalies and acids at ordinary temperatures. The prolonged action of hot water changes collagen into gelatin, a chemical reaction of great importance and from which is derived the term itself (collagen means "glue former"). Another characteristic property of collagen is its swelling by action of dilute acids and alkalies (3). The amino acid composition is roughly the same in the various collagens from different animals, but the relative percentage composition changes from animal to animal (4). The majority of the collagens show a high content of glycine, hydroxyproline, and of aromatic and sulfur containing acids (5, 6) Studies of collagen fibrils by physical methods, such as high and low angle X-ray scattering, electron microscopy, and polarization microscopy have put in evidence the fibrous nature of collagen and have shown the existence of a characteristic period, averaging 640 Å in collagen from the entire animal series (7). The 640 Å period has been observed also in collagen from fossil animals, for instance in the demineralized tusk of a 15,000 year old mammoth (4,7). On

* Secção de Vírus, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil.
** Secção de Microscopia Eletrônica, Universidade de S. Paulo, Brasil.
*** Depto. de Fisiología Geral e Animal, Universidade de S. Paulo, Brasil.
**** Laboratório de Ofiología, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.
Received, for publication, on 26.I.1955.

the other hand, high angle X-ray scattering, which reveals small spacings in the molecular architecture, shows differences in the spacings of the various collagens (8). Of all these methods, electron microscopy provides a special approach to the fine structure of the fibrils and to their arrangement in the cells and tissues by direct visualization. Unfortunately, due to only 10 Å resolving power of electron microscopes, details of the architecture of the polypeptide chains within the fibrils cannot yet be observed.

At present there are three major trends of research on collagen fibrils. The first is the consideration of its fine structure, starting from the spatial arrangement of the polypeptide chains forming the fibrils to the organization of the fibrils into the networks of the tissues and tendons. Such studies are being carried out intensively at the moment, but are far from completion (9,10). From such studies serious attempts have been made to reconstruct models of the polypeptide chains in the collagen fibrils. Of these the most promising at the moment are the models of Bear (4), Randall (11), Pauling (12) and Huggins (14), inasmuch as the model of Astbury has been proven unsatisfactory (13). The second trend is the study of the chemical properties of collagen fibrils, particularly with a view to improving the quality of leather (3, 15). Not only is collagen important as the raw material for the manufacture of gelatin and glue, but is extremely important in the manufacture of leather. The hide, or corium, has as its main component (35%) a network of collagen fibrils which give it strength and elasticity. To maintain these properties and to eliminate the disadvantage of putrescence, the collagen fibrils are rendered insoluble by reaction with tannins and chromium salts. These reactions can be controlled by observation with the electron microscope. In the third place, from the biological point of view, collagen is a structural protein intimately associated with the organization of tissues and organs. Therefore knowledge of the normal structure of the collagen fibrils from various tissues and organs, under differing physico-chemical conditions, is the starting point for the understanding of the changes which occur in normal tissues, e.g. histogenesis of the connective tissues and ageing process, as well as pathological changes such as those produced by collagenase in rheumatic fever or gangrene (16, 26).

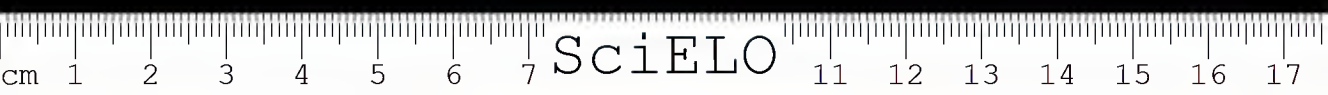
In the present study we aim to present some electron microscope observations of normal collagen fibrils from various tissues of several animals, principally reptiles; and to show the action of certain chemical and physical factors upon the fibril structure. It has seemed more suitable to present the methods, materials, results and discussion together under each section, rather than as separate chapters.

PERIOD AND FINE STRUCTURE OF FIBRILS

We have studied collagen fibrils associated with the myofibrils of the following skeletal muscles: external oblique of the toad, *Bufo paracnemis*, of the caiman, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802), of the snakes *Constrictor constrictor amarali* Stull, 1932 and *Liophis miliaris merremi* (Wied, 1821), of the pigeon and the human. From the reptilian series (caiman, snakes and the lizard, *Tupinambis teguixin* (L., 1758)) were used also collagens from the following muscles: hyoglossus, temporalis, retractor caudae, tip of tongue and heart. Observations were also made on collagen fibrils from veins and the deferent canal of the lizard and snakes. In addition we used tedons from the front feet, dorsum and tail of the albino rat, and tendon from the posterior poison gland of *Bothrops alternata* D.B. et D., 1854 and its homologue in *Constrictor*. The fibrils were prepared for electron microscopy by the technique previously described for preparation of myofibrils (35). Observations were made in both the Siemens, 100b, and the RCA, EMU, electron microscopes. Measurements were obtained from enlarged electron micrographs taken in the RCA, electron microscope whose magnification was determined within 5% error (17).

In all cases the collagen fibrils appear as single filaments, at times in a network or in bundles, presenting a characteristic cross striation formed by the alternation of dark and light bands, which have been called respectively *A* and *B* bands by Schmitt (18) and *D* and *H* bands by Wolpers (19). The dark bands are regions of high electron scattering power, meaning that they have a greater density or more atoms per unit volume than have the light bands. In the metal shadowed preparations the bands are clearly evident when the direction of shadowing is parallel or nearly parallel to the long axis of the fibril (Figure 1). In those preparations where the shadowing is at right angles to the long axis the bands are not clearly seen in the fibrils but the fibril contour is visible in the shadow. In unshadowed preparations the bands can be seen only when the fibrils are quite clean, i.e. when the ground substance layer, sometimes attached to the fibrils, does not cover and obscure the bands. It may be seen clearly in Figure 1 that the *A* band is higher than the *B*, thus giving to the fibril the aspect of a string of beads. However, this appearance is in reality due to the loss of water from the fibril, since it has been shown by means of replicas of wet collagen fibrils that the surface is uniformly smooth. It thus seems reasonable to assume that band *B* has a higher water content than band *A* (20). By selective staining with the so-called electron stains, i.e. osmic acid, phosphotugstic acid or uranyl acetate, a finer structure can

be evidenced in nonshadowed preparations. Four dark lines appear in the *A* band (a, b, c, d,) and a single line in the *B* band (e). Under certain conditions the "b" and "e" lines may appear to be split into two lines each, thus giving a total of seven lines (23). In shadowed fibrils not all the lines become visible. However, due to the fact that the "b" and "c" lines are of large diameter, they become prominent in clean fibrils that are shadowed parallel to their long axis (Figure 1,2), giving the appearance of an extra cross striation in the *A* band, having a period of 270 Å, the so-called intraperiod of shadowed preparations (27). The sum of the lengths of the *A* plus *B* bands adds up to an average of 640 Å, which agrees thus with the characteristic spacing of the dry collagen fibrils as revealed by small angle X-ray scattering (4). In all of our experiments we used metal shadowed specimens, hence variations of the sub-lines were not considered in this study.

Most of the previous work in the electron microscopy of collagen has involved formalin fixation since formalin does not change the intrinsic double refraction of collagen, hence does not change the arrangement of the polypeptide chains in the fibrils (28). Inasmuch as our studies include a variety of collagens it was deemed advisable to determine the influence of several fixatives before entering the definitive experiment. Thus the period and diameter of fibrils was determined after the use of formalin, Zenker's and Bouin's solutions, as well as unfixed material. The results obtained with the tendon from the salivary gland of *Constrictor* are presented in Table 1, where it will be seen that the average period is the same in the unfixed and the fixed materials, but that the range of diameters varies with the fixative. The aspects of the fibrils after such treatment is shown in Figures 1 and 2. On the basis of these results we used either unfixed material, or fixation with 5% formalin in the definitive experiments.

The final observations on the normal collagen fibrils included measurements of the period and diameter of a number of fibrils taken from different regions of various animals, and studies on the form of the fibril in general. In Table 2 are presented measurements of the length of period and diameter of fibrils from various organs and animals. It can be seen that although the period varies slightly, both from organs of the same animal or from animal to animal, it remains uniformly around 640 Å, confirming Bear's observations with low angle scattering (8). The diameters presented greater variability. In the fibrils from certain organs, e.g. tongue of the lizard, the diameters are uniform. In others, however, as for example from the tail of the caiman, Figure 3, the range of diameters may be extensive, in this case from 640 to 1400 Å. The constancy of period plus the variation in diameter of the fibril has been taken

by Bear (4) as the basis of his model of the collagen fibril to support the view that the fibril is composed of units, the protofibrils, whose diameter is many times smaller than that of the fibril and whose composition is that of few polypeptide chains, the whole aligned in such manner as to give constant period

It is believed that the collagen fibril is composed of a series of hollow rings (27) and indeed electron micrographs of cross sections of tendons (9) have been presented showing the hollow appearance. These observations in no way disagree with the observations made with the polarizing microscope (28) indicating that collagen fibrils have both form and intrinsic birefringence, inasmuch as the protofibrils are located only in the periphery. Randall (9) disagrees with the idea of the hollowness of the fibril, claiming that if true the fibril should show less density than in fact is the case. As a result of the present studies we believe that the fibril is hollow, and understand as "hollowness" the absence of protein or other solid material and the presence of a liquid phase in the core of the fibril. The liquid phase disappears during the drying process in the preparation of the fibril for the microscope, leaving a partially collapsed fibril of beaded appearance. In ultrathin sections the fibrils appear hollow due to the preservation of the tridimensional structure and the loss of water during fixation. The general form of the collagen fibril is well illustrated in a series of photographs of the tendons of the posterior poison gland of *Bothrops* (Figures 5 and 6). The tendon was left in physiological saline at 4-5 degrees C for 6 weeks for maceration, then washed and blended in distilled water, dried and shadowed with chromium. It will be seen that some of the fibrils split lengthwise showing in the region of the split a series of incomplete rings(5A, 6A). In others the orientation of the section of the fibril is such that one can observe a hollow, broken end (5A). And in still others the extremities of the fibrils are flattened out (5B) or frayed (6B), suggesting that the inner material has been drawn off during the drying process. If, as we believe on the basis of these preparations, the fibril has a liquid, or semi-liquid core, then Randall's comments are no longer valid. Further evidence of the ring structure of the fibril is the extensibility. Under the action of tension along the length of the single fibril (the whole tendon cannot be greatly extended as it breaks too easily) the fibril increases in length, principally by change of length of the light and with little or no change in the dark band. If the tension is sufficient the rings appear to separate, breaking the fibril into units comparable to the sarcomeres of myofibrils. This process can be best observed in fibrils under tension caused by breakage of the supporting grid film in the electron microscope (as in Figure 4 showing fibrils of unfixed tail tendon being deformed by longitudinal tension due to film breakage), inasmuch as stretch of the single fibril by other means is exceedingly difficult. Such observations

play an important role in the visualization of the disposition of the amino acids in the polypeptide chains inasmuch as in collagen the alpha-beta keratin chain model cannot be applied (4. 29).

ACTION OF HOT WATER ON FIBRILS

It is well known that, under the prolonged action of hot water, collagen dissolves and turns into gelatin. For tendon there is a characteristic shrinkage temperature which depends upon the medium and the previous treatment of the tendon (3). For fresh tendon in water this temperature is from 60 — 65 degrees C. Fresh tendon, at this temperature, first suffers a sudden shortening accompanied by increase in diameter and decrease in period. Upon further heating the tendon is dissolved slowly and is changed into an amorphous structure, as indicated by low angle X-ray scattering (3, 4). We have carried these observations further by noting the changes in single fibrils by means of the electron microscope, using rat tail tendon. The single fibrils after two minutes in distilled water at 60 degrees C shorten in length, decrease in period and increase in diameter, thus indicating that the macroscopical changes mentioned above are the result of changes at the fibrillar level (Figure 10A). At 40 degrees C no change in the structure of the fibrils could be observed (Figure 10B). At 60 degrees C after two minutes the extremities of the fibrils begin to lose their shape. After a longer exposure the striations begin to disappear, showing that the loss of the characteristic long spacing (revealed by low angle X-ray scattering) is accompanied by the loss of the 640 Å period, thus indicating that the two are actually the same. After further exposure at this temperature the fibrils dissolve completely. At 100°C the changes occur with great rapidity. Within two minutes the fibrils are changed completely into gelatin.

Our results with the rat tendon thus agree with those of Lelli (30) for human dermis.

The action of the hot water can be interpreted as follows (4). The protofibrils are first changed from the orderly state, normally occuring in the intact collagen fibril, into a disordered state. With continued exposure the hot water changes the collagen protofibrils into free gelatin molecules.

ACTION OF DILUTE ACETIC ACID ON TENDON

Years ago Nageotte (31) showed that rat tail tendon could be dissolved in dilute acetic acid (10^{-4} molar) producing a clear and very viscous solution.

This observation has been extended to collagens of different animal origins (cf. Bear for references (4)). The collagen can be reprecipitated from the viscous solution by changing the salt concentration by dialysis, or by diluting with suitable buffers of definite pH (32, 34). The reprecipitated collagen presents the same structure as the original, as shown by X-ray diffraction (33), i. e. the 640 A spacing, but a less orderly internal arrangement. The understanding of the reprecipitation of collagen from solution, as well as the reaction of collagen solutions with mucoproteins (34), polysacharides, glucoproteins and nucleic acid derivatives (7), which also produce precipitates formed of banded fibrils, is of the utmost importance for obtaining information on the mechanism of fibrogenesis in tissues.

In view of the fact that descriptions in the literature of the exact conditions for dissolution and reprecipitation of collagen are incomplete (32) we have repeated these experiments with several types of collagen from several animals, varying the temperature, molarity of acetic acid, pH, and ionic concentration. We have thus determined the definite conditions necessary for precipitation of certain collagens, and have discovered that certain others enter only with difficulty, or not at all, into solution, and that temperature plays an important part in the process.

A. — Rat Tail Tendon — If rat tendon is placed, under sterile conditions, in any volume of 10^{-4} molar acetic in stoppered flasks at 4-5°, or at 37°C, only a very small fraction of the tendon is dissolved. Macroscopical changes, however, can be observed; the changes differing with the temperature. After repeated efforts we succeeded in obtaining better than 95% dissolution by freezing the tendon first with dry ice, cutting with a microtome into sections 30-40 microns thick, then placing the acetic acid at 37° for 6 hours under sterile conditions. The entrance into solution was aided by periodical shaking with glass beads. Repeating the process without the cutting also proved successful. Thus the prefreezing in some way permits easier dissolution, perhaps by acting upon the ground substance that surrounds the collagen. Frozen tendon did not dissolve at 4-5° C. The relative amounts of tendon and acetic acid are not critical. In the final experiments we used a ratio of one part moist tendon to five parts of 10^{-4} molar acetic acid by weight, inasmuch as higher ratios produce solutions too viscous to be filtered through the Seitz filters. The viscous solution of collagen thus produced was filtered through a Seitz filter to eliminate any suspended matter or any undissolved fibrils, and the filtrate examined in the electron microscope. No fibrillar structures could be found in the final solution. The reprecipitation process depended greatly upon the temperature. The best precipitates were produced using one part of collagen

solution to five parts of 0.1 molar citric acid-sodium citrate buffer by volume at pH 4.9. At 4-5° C no visible precipitate in the collagen-buffer mixture can be observed even after one week. Low speed centrifugation (Servall, 5000 rpm, 2 hours) did not separate out any observable fibrillar precipitate. If, however, the collagen solution and the buffer, both previously brought to room temperature, are mixed and let stand at room temperature, a complete precipitation is obtained within two hours. This white, gelatinous precipitate can be easily separated from the supernatant liquid by decantation or by centrifugation. For examination in the electron microscope the salts were washed out by repeated washings with distilled water and recentrifugation. The final precipitate, suspended in distilled water, was then examined in the usual way and found to contain characteristic collagen fibrils of the same period as those in the original fibrils. In general the reprecipitated fibrils showed sharp contours, although the extremities appeared somewhat frayed. In various preparations there appeared several types of fibrils, varying from short, non-striated (Figure 9A), to longer, non-striated (Figure 7B), longer striated (Figure 8) and finally definitive fibrils (Figure 9). It is tempting to suggest that these represent stages in the formation of the cross striated collagen fibril, i.e. that the cross striation occurs after the fibril reaches a certain length and probably a certain tension.

B — *Salivary Gland Tendon* — Attempts to repeat the experiment above with the posterior tendon of the labial glands of *Constrictor* failed, even when longer contact times were used. This difference in behaviour is puzzling inasmuch as both the rat tail, and the gland tendon are pure tendons without other tissue involved. The gland tendon showed a certain degree of swelling after 24 hours in the acetic acid. Fibrils fixed in 5% formalin, blended in distilled water and examined in the usual way in the electron microscope, showed an increase in period of cross striation with decrease in sharpness of outline of striations.

C — *Tendons From Various Parts of Body* — The two previous experiments strongly suggest that the dissolving power of the acetic acid depends upon the animal, upon the region of the body from which the tendon is taken, and upon the preteatment. Without previously freezing the tendon the action of acetic acid appears to be limited to swelling, the amount and type of which depends upon the temperature.

To test this thesis, tendons were taken from the tail, dorsum and paws of albino rats. Pieces of approximately the same size from each region were placed, without prefreezing, in 10^{-4} molar acetic acid under sterile conditions at 4° and 37°C and thus maintained for 24 hours. Subsequently they were

fixed in 5% formalin, blended in distilled water and prepared for electron microscopy. In one set of experiments the acetic acid was brought to the desired temperature before adding the tendon. In a second series the tendons were placed in the acetic acid at room temperature and then brought to the desired temperatures. The results differed considerably, as will be shown below.

At the lower temperature (4°C) the tendons swell amazingly and become transparent; having the appearance of a rigid jelly and the tendons do not lose their shape even after shaking (Figure 11). At 37°C, on the other hand, the tendon swells less, becomes opaque and loses its silken appearance. The fibrils from the tendons brought gradually from 37° to 4°C appeared in the electron microscope as zig-zag fibrils of short and irregular period (Figure 12). This phenomenon principally was seen in the tendons from the tail and dorsum. In some of the zig-zag fibrils the period was maintained, in others it disappeared. No zig-zag fibrils were observed at 37°C.

The meaning of the formation of the irregular, zig-zag type of fibril is not clear from these studies. It seems to be related to the effect of temperature inthat when the tendons are placed directly in acetic acid previously cooled to 4°C no zig-zag formation occurs. Thus it is evident that it is caused by the gradual lowering of the temperature. Noticeable also was the fact that only at the low temperature was the cross striation lost, while at the higher temperature the striations continued observable even when the fibril was apparently disintegrating along the long axis. In fact, the aspect of the fibrils after being treated with acetic acid at 37°C is similar to that after treatment with water at 60°C.

ACTION OF DILUTE ALKALI ON TENDON

It has been held previously that dilute alkali does not attack collagen. However, Gross (16), has shown that 0.1 normal sodium hydroxide causes fragmentation of the collagen fibrils in the transverse direction and eventually causes the reduction of some fibrils to an amorphous mass. Attempts to repeat the experiments of Gross with tendon from the labial glands of *Constrictor* were unsuccessful. The collagen fibrils were isolated as described previously and suspended in 10^{-4} normal sodium hydroxide. Controls were made by suspending tendons in distilled water. Both were then left for 24 hours at 37°C and at 0°C and subsequently examined in the electron microscope. As far as could be determined from the micrographs no changes occurred. Thus these experiments show that either (1) dilute alkali does not have an effect upon

tendon, as previously believed, but that a stronger concentration could have or (2) that, as found in other experiments mentioned above, the effect of an agent upon collagen will depend greatly upon the animal and region from which the tendon is taken. Further experimentation is underway to clarify this point.

SUMMARY

Collagen fibrils from various organs of toad, reptiles, pigeon, rat and human have been studied by means of the electron microscope. Observations have been made upon the influence of stretch, fixatives, salts, acids, alkalis and temperature upon the structure of the fibril. Also studied were the conditions necessary for dissolution and reprecipitation of collagen.

The normal fibrils from various organs of different animals showed an identical period, but varied considerably in diameters. The variation was more marked in certain animals and organs than in others, e.g. fibrils from lizard tongue were extremely uniform, whereas those from the tail of the caiman varied considerably.

Fibrils were observed fresh, and fixed in formalin, Bouin's fluid and Zenker's fluid. In all cases the period remained uniform, but the diameter of the fibrils appeared to vary with the fixative. Greatest uniformity was obtained with 5% formalin.

When subjected to tension the fibril increases in length, principally in the light band. With continued tension the fibril breaks into individual units of the length of the two bands only.

Tendons left in physiological saline for long periods of time easily split longitudinally during blending and show considerable flattening when dried on the grids. In many fibrils thus treated may be seen incomplete rings in the periphery of the fibril, or a hollow core at the extremities. We thus believe the fibril to normally have a liquid, or semiliquid, core.

At 40°C the fibrils show no change in water. Within two minutes of exposure to water at 60°C the fibrils begin to lose their shape. On continued exposure the fibrils shorten, increase in diameter with conseqent shortening of period, slowly dissolve and finally become an amorphous gelationous mass. At 100°C these changes occur within 2 minutes. The hot water appears to change the collagen protofibrils into free gelatin molecules, by stages in which the protofibrils are changed from the normal orderly to a disorderly state.

Temperature was found to play an important role in dissolution and reprecipitation of the fibrils. Prefreezing the tendons was necessary to cause their

dissolution in the acetic acid. At 4-5° dissolution is extremely slow; at 37°C quite rapid. Reprecipitation at 4-5° does not occur within one week, whereas it is complete within 2 hours at 37°C.

Fibrils dissolved in acetic acid and reprecipitated in citrate buffer showed several stages of reformation. It is believed that the sequence is: (1) short, non striated fibrils, (2) long, non-striated fibrils, (3) long, striated fibrils. Thus it appears that a certain length of fibrils and certain tension is necessary for the formation of the striation in the reprecipitated fibrils.

Tendons from the tail, dorsum and paw of the white rat showed different responses to the same treatment. Attempts to dissolve and reprecipitate the posterior tendon of the labial glands of *Constrictor* were unsuccessful. Thus it was found that the conditions necessary for dissolution and reprecipitation of collagen fibrils varies with the animal and organ of origin.

Non-prefrozen tendons added to acetic acid precooled to 4°C swell and become transparent but remain linear in form. Those put in acetic acid at 37°C and then lowered do 4°C show a zig-zag form. No zig-zags are formed at 37°C.

Dilute alkali appeared to have no effect upon *Constrictor* tendon at either 4° or 37°C.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our thanks do Mr. Adolpho Brunner, Jr., and to Miss Cecilia Doneux for their technical assistance. The work was aided in part by grants from the Rockefeller Foundation and the Conselho Nacional de Pesquisas.

BIBLIOGRAPHY

1. Maximov, A. A. and Bloom, W. — Textbook of Histology, Saunders Pub. Co., Philadelphia, 1943.
2. Astbury, W. T. — Adv. in Enzymology. 3:63. 1943.
3. Kanagy, J. R. — National Bureau of Standards, Circular C 458, 1947.
4. Bear, R. S. — Adv. Protein Chemistry, 7:69, 1953.
5. Newmann, R. E. — Arch. Biochem., 24:289, 1949.
6. Tristam, G. R. — Adv. Protein. Chemistry, 5: 84, 1994.
7. Randall, J. T., Fraser, R. D. B., Jackson, S., Martin, A. V. W. and North, A. C. T. Nature, 169: 1029, 1952.
8. Marks, M. H., Bear, R. S. and Blake, C. H. — Jour. Exp. Zool., 11:55, 1949.
9. Randall, J. T. and Jackson, S. F. — Nature and Structure of Collagen, Butterworths Scientific Publications, London. 1953.
10. Edsall, J. T. — Science, 119: 302, 1954.

11. Randall, J. T., Fraser, R. D. B. and North, A. C. T. — Proc. Royal Soc., B. 141:1, 1953.
12. Pauling, L., and Corey, R. B. — Proc. Nat. Acad. Sciences, 37: 235, 1951.
13. Astbury, W. T. — Jour. Int. Soc. Leather Chem., 24:69, 1940.
14. Huggins, M. L. — Jour. Amer. Chem. Soc., 76: 4045, 1954.
15. Gustavson, K. H. — Adv. Protein Chem., 5:354, 1949.
16. Gross, J. — Ann. New York Acad. Sciences, 56:674, 1953.
17. Souza Santos, H. L., and Souza Santos, P. — Ciência e Cultura, 4:107, 1952.
18. Schmitt, F. O., Hall, C. E. and Jakus, M. A. — Jour. Cellular and Comp. Physiol., 20:11, 1942.
19. Wolpers, C. — Klin. Wochschr., 22:624, 1943.
20. Gross, J. and Schmitt, F. O. — Jour. Exp. Med., 88:55, 1948.
21. Wolpers, C. — Arch. Path. Anat. Physiol., 312: 292, 1944.
22. Schmitt, F. O., Hall, C. E., and Jakus, M. A. — Jour. Appl. Physics, 16:263, 1945.
23. Nutting, G. C and Borasky, R. — Jour. Amer Chem. Ass., 43:96, 1948.
24. Pratt, A. W. and Wyckoff, R. W.G. — Bioch Biophys. Acta, 5:166, 1950.
25. Bear, R. S. — Jour Amer Chem Soc., 64:727, 1942.
26. Bidwell, E., van Heyningen, W. E. and Charlwood, P. A. — Biochem. Jour., 42:140, 1948.
27. Wyckoff, R. W. G. — Electron Microscopy, *Interscience Publ. Co.*, 1949.
28. Pfeiffer, H. H. — Arch. Exp. Zellforsch. Gewebzucht, 25:92, 1943.
29. Low, B. W. — in Proteins, *Academic Press Inc.*, N. Y., 1 Part A., 1953.
30. Lelli, G. — Jornada Médica, 5:397, 1952.
31. Nageotte, J. and Guyon, L. — Arch. Biologie, 41:1, 1935.
32. Noda, H. and Wyckoff, R. W. G. — Biochim. Biophys. Acta, 7:494, 1951.
33. Wyckoff, R. W. G. and Corey, R. B. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 34:285, 1936.
34. Highberger, J. H. Hall, C. E. and Schmitt, F. O. — Proc. Nat. Acad. Sci., 37:286, 1951.
35. Edwards, G. A., Souza Santos, H. L., Souza Santos, P. and Sawaya, P. — Ciência e Cultura, 5:27, 1953.

TABLE I

INFLUENCE OF VARIOUS FIXATIVES UPON TENDON OF LABIAL GLAND OF SNAKE.

Fixative	Non-fixed	5% formalin	Bouin	Zenker
Period (Å)	660	660	660	660
Length (Å)	1000-1600	1400-2000	830-2600	1100-1300

TABLE II

PERIODS AND DIAMETERS OF COLLAGEN FIBRILS FROM SEVERAL ANIMAIS

(in Angstrom units)

Animal	Snake	Lizard	Caiman	Toad	Pigeon	Woman
Organ						
External oblique				d=798 p=630	d=798 p=600	d=798 p=570
Heart	d=1100 p=600					
Temporalis	d=630 p=590					
Hyoglossus	d=600 p=600	d=640-900 p=640				
Labial gland tendon	d=1400-2000 p=660					
Vein	d=800 p=630					
Deferent canal	d=630 p=600					
Retractor of hemipenis	d=900 p=600					
Tail			d=640-1400 p=640			
Tongue		d=600 p=590				

ESCORPIÕES E ESCORPIONISMO NO BRASIL

III. Titulação, por meio de camundongos, das peçonhas de *Tityus costatus* (Karsch), *Tityus trivittatus* Kraepelin, 1898 e *Bothriurus bonariensis* (Koch), 1842.

WOLFGANG BÜCHERL & NICOLINA PUCCA

(Laboratório de Zoologia Médica, Instituto Butantan)

INTRODUÇÃO

Os representantes de *Tityus costatus* e *T. trivittatus* possuem aproximadamente as mesmas dimensões das duas espécies perigosas ao homem, *Tityus serrulatus e T. bahiensis*. Sua peçonha sêca é igualmente quase tão abundante quanto a das últimas. Em se tratando, pois, de representantes de um e mesmo gênero, pareceu-nos interessante investigar a intensidade de ação da peçonha das duas primeiras espécies e compará-la com a de *T. bahiensis* e *serrulatus*.

O interêsse na elucidação da ação da peçonha de *Bothriurus bonariensis* não é menor, pois êste escorpião é muito frequente pelo Brasil afóra, principalmente nos Estados sulinos e na Argentina, no Uruguai e Paraguai.

MORFOLOGIA EXTERNA E HABITAT

O *Tityus costatus* atinge 75 mm. O colorido do cefalotórace é castanho escuro, com "marmorações" mais claras e bordas denegridas. Cauda amarela, escurecendo para trás; segmento V quase negro; vesícula amarela; esternitos e pernas amarelados, manchados de escuro. Mão manchada nas fêmeas, estreita e sem "lobo"; amarela nos machos, larga e com "lobo" basilar entre os dedos. Pentes com 16 dentes nas fêmeas e 17 nos machos.

Habitat: — Serra dos Órgãos e ilha de São Sebastião.

Recebido, para publicação, em 8. III. 1955.

O *Tityus trivittatus*, escorpião com 55 a 70 mm de comprimento, apresenta um cefalotórace amarelado com três faixas longitudinais negras; cauda amarela, escurecendo para trás; pernas amarelas; pentes com 20 a 22 dentes.

Habitat: — Uruguai, Paraguai, Argentina — *Tityus trivittatus confluens* (Borelli, 1899), Brasil-Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Goiás — *Tityus trivittatus charreyroni* (Vellard, 1932), Minas Gerais e Rio de Janeiro — *Tityus trivittatus dorsomaculatus* (Lutz & Mello, 1922).

O *Bothriurus bonariensis* (Koch), 1842 atinge entre 50 e 55 mm de comprimento. É um escorpião preto, brilhante, com fosseta sub-redonda na área dorsal da vesícula caudal, preta nas fêmeas, amarela ou alaranjada nos machos. Pentes com 21 a 24 dentes.

Habitat: Uruguai, Paraguai, Bolívia, Argentina, Brasil do Sul e Central — *Bothriurus bonariensis araguayae* (Vellard, 1934). É o escorpião mais encontradiço no Rio Grande do Sul. Representantes desta espécie foram recebidos da zona noroeste do Estado de São Paulo e do outro lado da fronteira com Minas Gerais. O escorpião preto destas últimas regiões foi descrito como *Bothriurus magalhaensi* Mello-Leitão, 1937. Um confronto, porém, de séries não deixa dúvida de que deve ser incorporado na espécie de *B. bonariensis*.

MÉTODO

A peçonha dos referidos escorpiões era retirada por choque elétrico, sêca e guardada em vácuo, ao abrigo da luz, à temperatura comum de laboratório. Um *T. trivittatus* fornecia, em média, 0,25 mg; um *T. costatus*, 0,20 mg; e um *Bothriurus bonariensis* apenas 0,10 mg de peçonha sêca. Nas re-extrações, repetidas de mês em mês, as quantidades diminuiram ainda mais.

No dia da titulação pesavam-se as peçonhas e dissolviam-se três vêzes, por centrifugação e redissolução do resíduo, em volume determinado de salina com 0,85% de cloreto de sódio.

Para a titulação das glândulas cortavam-se os "telsa" dos respectivos escorpiões e armazenavam-se em glicerina neutra, a 3.°C. Os "telsa", retirados da glicerina, eram triturados, adicionando-se volume conhecido de salina. Praticavam-se, após maceração a frio, 3 centrifugações e redissoluções do resíduo, sempre em volume certo de salina.

As soluções-mãis, límpidas com as peçonhas puras, um tanto opalescentes e turvas com as glândulas totais, como as respectivas diluições, eram rigorosamente estandartizadas, aquelas em relação ao pêso das peçonhas sêcas em determinado volume de diluição, estas em relação ao número ou fracção de glândula venenífera por volume certo de veículo.

Empregavam-se camundongos do mesmo sexo e com pêso de 20 g cada, com dois gramas de tolerância, oriundos dos biotérios do Butantan, isto é, criados da mesma estirpe e sob o mesmo ambiente e idêntica alimentação.

As pipetagens e dosagens se executavam com instrumentos rigorosamente calibrados. O "inoculum" era sempre de 0.5 ml. por animal. As injeções se davam devagar em uma das veias caudais ou sob a pele da barriga.

O estabelecimento da dose 50% letal era executado pelo método de Reed e Muench, entrando no resultado o cálculo das mortalidades acumuladas e sucessivas de todos os lotes de animais ensaiados.

RESULTADOS

I. *Bothriurus bonariensis*

a) LD 50 da peçonha sêca, por via intravenosa:

Lote	Peçonha mg	Camundongos			Acumulação d. result.			% de mortalidade
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	0,025	5	5	0	25	0	25	0
2	0,050	5	5	0	20	0	20	0
3	0,1	5	5	0	15	0	15	0
	0,2	5	5	0	10	0	10	0
5	0,4	5	4	1	5	1	6	16,6
6	0,8	5	1	4	1	5	6	83,2
7	1,6	5	0	5	0	10	10	100
Fator de diluição: 2		35	25	10	76	16	92	LD 50 = 0,6 mg ±

b) LD 50 da peçonha sêca, por via subcutânea:

Lote	Peçonha mg	Camundongos			Acumulação d. result.			% de mortalidade
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	0,2	5	5	0	18	0	18	0
2	0,4	5	5	0	13	0	13	0
3	0,8	5	5	0	8	0	8	0
4	1,6	5	3	2	3	2	5	40
5	3,2	5	0	5	0	7	7	100
Fator de diluição: 2		25	18	7	42	9	51	LD 50 = 2 mg ±

c) LD 50 das glândulas totais, por via intravenosa:

Lote	Grândula venenífera	Camundongos			Acumulação d. result.			% de mortalidade
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	1,60	5	5	0	12	0	12	0
2	1,49	5	4	1	7	1	8	12,5
3	1,90	5	2	3	3	4	7	57,0
4	2,70	5	1	4	1	8	9	89,0
5	3,70	5	0	5	0	1	13	100
Fator de diluição: 1,39		25	12	13	23	26	49	LD 50 = 1,8 gl ±

d) LD 50 das glândulas totais, por via subcutânea:

Lote	Grândula venenífera	Camundongos			Acumulação d. result.			% de mortalidade
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	2,7	5	5	0	14	0	14	0
2	3,7	5	5	0	9	0	9	0
3	5,2	5	3	2	4	2	6	33
4	7,2	5	1	4	1	6	7	86
Fator de diluição: 1,39		20	14	6	28	8	36	LD 50 = 5,85 gl. ±

II. *Tityus costatus*

a) LD 50 da peçonha sêca, por via intravenosa:

Lote	Peçonha mg	Camundongos			Acumulação d. result.			% de mortalidada
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	0,1	5	5	0	16	0	16	0
2	0,13	5	5	0	11	0	11	0
3	0,17	5	4	1	6	1	7	14,3
4	0,21	5		3	2	4	6	66
5	0,28	5	0	5	0	9	9	100
Fator de diluição: 1,292		25	16	9	35	14	49	LD 50 = 0,20 mg ±

b) LD 50 da peçonha sêca, por via subcutânea:

Lote	Peçonha mg	Camondongos			Acomolação d. resolt.			% de mortalidade
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	0,178	5	5	0	12	0	12	0
2	1,000	5	4	1	7	1	8	12,5
3	1,120	5	2	3	3	4	7	57,1
4	1,260	5	1	4	1	8	9	90,0
5	1,410	5	0	5	0	13	13	100,0
Fator de diluição:_1,12		25	12	13	23	26	49	LD 50 = 1, 10 m ±

c) LD 50 das glândulas veneníferas, por via intravenosa:

Lote	Glândola venenifera	Camundongos			Acumulação d. result.			% de mortalidade
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	1,00	5	5	0	21	0	21	0
2	1,12	5	5	0	16	0	16	0
3	1,26	5	4	1	11	1	12	8,3
4	1,41	5	3	2	7	3	10	30,0
5	1,59	5	2	3	4	6	10	60,0
6	1,78	5	1	4	2	10	12	83,1
7	2,00	5	1	4	1	14	15	93,0
Fator de diloição: 1,12		35	21	14	62	34	96	LD 50 = 1,52 gl. ±

d) LD 50 das glândulas veneníferas, por via subcutânea:

Lote	Glândola venenifera	Camundongos			Acumulação d. result.			% de mortalidade
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	1,00	5	5	0	11	0	11	0
2	2,00	5	4	1	6	1	7	14
3	4,00	5	2	3	2	4	6	66,6
4	8,00	5	0	5	0	9	9	100,0
Fator de diluição: 2		20	11	9	19	14	33	LD 50 = 3,4 gl. ±

III. *Tityus trivittatus*

a) LR 50 da peçonha sêca, por via intravenosa:

Lote	Peçonha mg	Camundongos			Acumulação dos results.			% de mortalidade
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	0,0016	5	5	0	16	0	16	0
2	0,0032	5	5	0	11	0	11	0
3	0,0064	5	4	1	6	1	7	14,3
4	0,012	5	2	3	2	4	6	66,6
5	0,025	5	0	5	0	9	9	100
6	0,050	5	0	5	0	14	14	100
Fator de diluição: 2		30	16	14	35	28	63	LD 50 = 0,014 mg ±

b) LD 50 da peçonha sêca, por via subcutânea:

Lote	Peçonha mg	Camundongos			Acumulação dos results.			% da mortalidade
		total	vivos	mortos	vivos	mortos	total	
1	0,0064	5	5	0	18	0	18	0
2	0,0128	5	5	0	13	0	13	0
3	0,025	5	4	1	8	1	9	10
4	0,050	5	3	2	4	3	7	42,8
5	0,10	5	1	4	1	7	8	87,5
6	0,20	5	0	5	0	12	12	100
7	0,40	5	0	5	0	17	17	100
Fator de diluição: 2		35	18	17	41	40	81	LD 50 = 0,059 mg ±

COMPORTAMENTO DOS CAMUNDONGOS

A peçonha de *Bothriurus bonariensis,* quer proveniente de extratos glandulares, quer sob forma pura, parece não ser muito dolorosa. Sua ação sôbre a sudorese, as glândulas lacrimais e salivares é mínima. A marcha da intoxicação é lenta, generalizada, patenteando-se principalmente por aceleração do ritmo cardíaco, respiração curta, ofegante, intermitente. A morte sobrevém por asfixia.

A eliminação da peçonha parece estar completa depois de 24 horas.

A ação da peçonha de *Tityus costatus* é semelhante à de *T. bahiensis*, ainda que menos intensiva e menos dolorosa. A sudorese, entretanto, é menos acentuada. O progresso da intoxicação pode ser observado pelo ritmo respiratório que de normal passa a acelerado, ofegante e intermitente, determinando, nos casos graves, morte por asfixia. O restabelecimento dos sobreviventes é completo entre 16 e 24 horas.

Bem mais enérgica é a ação da peçonha pura de *Tityus trivittatus*, igualando-se à de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Quando injetada na veia na quantidade de 0,0008 mg por camundongo, já são nítidos os sintomas de intoxicação, traduzidos por respiração irregular ou intermitente, com acessos de dispnéia, suor profuso na cabeça toda (menos na nuca, como acontece com as peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*), grande excitação e irritabilidade. Os animais, assentados sôbre as pernas posteriores, com a cabeça muito erguida, esfregam continuamente, com as pernas anteriores, a região buco-nasal, emitindo gritos de dôr e reagindo a qualquer distúrbio externo com manifestações exageradas de pulos e correrias.

Com 0,006 mg êstes sintomas são ainda mais pronunciados; com 0,012 mg já se verificam mortes por asfixia entre 15 e 48 minutos; em doses correspondentes a 0,025 mg os sintomas são ainda mais dramáticos. Primeiro os animais esfregam desesperadamente o focinho; transpiram no lado inferior do pescoço e a respiração é ofegante, rápida, irregular, interrompida por ataques dispnéicos. Acessos de furor impelem-nos a correrias e pulos desordenados, seguidos de prostração. O descontrole nervoso generaliza-se já dentro de 3 minutos. Daí por diante os animais já não se mantêm sôbre as pernas. Arrastam-se e rolam do lado, morrendo por asfixia em tôrno de 7 minutos após a injeção.

A progressão da intoxicação é um pouco mais lenta, quando a peçonha for injetada por via subcutânea, embora não difira desta mesma.

Concomitantemente à dôr local parece haver um *efeito excitatório* do sistema nervoso (central e vegetativo), traduzido por suores, pulos, correrias, respiração acelerada. Depois sobrevém a *fase depressiva* (prostração geral, ataques de dispnéia, cegueira), seguida pela morte por asfixia.

Parece-nos impossível distinguir êstes sintomas dos provocados pela peçonha de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, não sòmente quanto à intensidade como também quanto à progressão.

COMPARAÇÃO ENTRE A TOXICIDADE DAS PEÇONHAS ESCORPIÔNICAS DO BRASIL

LD 50 em mg de peçonha sêca por grama de camundongo

Escorpião	intravenosa	subcutâne-
Tityus serrulatus	0,0003-0,0007	0,0003-0,0012
Tityus bahiensis	0,0004-0,004	0,0007-0,009
Tityus trivittatus	0,0005	0,0029
Tityus costatus	0,01	0,05
Bothriurus bonariensis	0,03	0,1

MÉDIAS, EM MG, DE PEÇONHAS PURAS, COLHIDAS POR CHOQUE ELÉTRICO

Escorpião	1.ª-3.ª extração	6.ª-15.ª extração
Tityus serrulatus	0,20-0,33	0,055-0,08
Tityus bahiensis	0,20-0,23	0,03 -0,098
Tityus trivittatus	0,11-0,18	0,07 -0,1
Tityus costatus	0,08-0,12	0,03 -0,06
Bothriurus bonariensis	0,02-0,05	0,006-0,01

CONCLUSÃO

O escorpião *Bothriurus bonariensis* não deve ser temido. Sua aguilhoada nunca será fatal ao homem, nem mesmo poderá determinar intoxicação grave ou de média gravidade. Ainda que, em picadas repetidas, se esvasiasse o conteudo total das duas glândulas veneníferas, jamais poderiam resultar acidentes graves. Não há, portanto, necessidade de recorrer-se a qualquer tipo de sôro anti-escorpiônico. Anti-álgicos e sedativos constituem as medicações aconselháveis, ao lado do esclarecimento de tratar-se de um escorpião dos mais inofensivos.

O *Bothriurus magalhaensi* é por nós considerado como sinônimo de *B. bonariensis*.

O *Tityus costatus,* ao par da raridade, também não é portador de uma peçonha tão ativa, que sua aguilhoada devesse inspirar cuidados especiais, além de medicações anti-álgicas.

O *Tityus trivittatus,* entretanto, parece-nos dotado de uma peçonha de ação tão enérgica como a de *Tityus bahiensis* e mesmo de *T. serrulatus.* Afigura-se-nos, pois, perfeitamente possível que se verifiquem no homem, especialmente em crianças de pouco pêso, acidentes tão graves que, por falta de sôro específico, clamem pela administração precoce (entre 15 a 30 minutos após o acidente) do sôro anti-escorpiônico do Instituto Butantan, feito contra as peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis.* Por pertencerem os representantes das três espécies ao mesmo gênero *Tityus* é de supôr-se que o mencionado sôro diminua sensivelmente a gravidade da intoxicação quando administrado para fins curativos.

Felizmente é o *T. trivittatus* um escorpião raro, ocorrendo apenas em zonas bem limitadas, geralmente montanhosas, havendo, portanto, bem poucas possibilidades de um contato direto com o homem.

SUMÁRIO

As peçonhas sêcas, obtidas por excitação elétrica, e os extratos glandulares dos escorpiões brasileiros, *Bothriurus bonariensis* (*B. magalhaensi* parece-nos sinônimo dêste), *Tityus costatus* e *T. trivittatus,* foram tituladas em camundongos, estabelecendo as quantidades médias mortais (LD 50%), tanto por via intravenosa como subcutânea. Apenas a peçonha de *T. trivittatus* tem-se revelado quase tão ativa quanto as de *T. serrulatus* e *T. bahiensis;* poderá mesmo oferecer um certo perigo ao homem, diminuido felizmente pela raridade dêste aracnídeo, perigo êste a ser combatido, em casos graves, além de medicações anti-álgicas e sedativas, pelo sôro anti-escorpiônico do Instituto Butantan.

Em tabelas comparativas foram fornecidas as médias em mg de peçonha sêca, obtida por choque elétrico bem como as DL 50 para camundongos. Descreveu-se também a sintomatologia da intoxicação dos camundongos.

SUMMARY

The dried venoms, obtained from the three Brazilian scorpion species, *Bothriurus bonariensis* (*B. magalhaensi* seems to be synonymic), *Tityus costatus* and *T. trivittatus,* by the "electric shock method", were tested on mice. The LD 50% is established and the results are compared with the *T. serrulatus* and *T. bahiensis* venoms.

Only the venom of the rarer species, *Tityus trivittatus*, seems to be as active as the *serrulatus* or *bahiensis* venoms, so as to call, in severe cases, for serum therapy with the anti-scorpionic serum from Butantan.

The amounts of dry venoms from these Brazilian scorpions are given and the symptomatology of the intoxication of mice is also described.

ZUSAMMENFASSUNG

Die durch elektrische Reizung periodisch erhaltenen und im Vakuum getrockneten Reingifte der drei brasilianischen Skorpionarten, *Bothriurus bonariensis* (mit dem wir die Art *B. magalhaensi* als synonym ansehen), *Tityus costatus* und *Tityus trivittatis* wurden weissen Mäusen intravenös und subcutan eingespritzt und die jeweiligen 50% — igen tödlichen Dosen gewichtlich festgelegt.

Die Ergebnisse wurden mit den von uns schon ermittelten mittleren tödlichen Dosen der Reingifte von *Tityus serrulatus* und *T. bahiensis* verglichen und festgestellt, dass eigentlich nur der, zum Glücke, sehr seltene *T. trivittatus* ein hochwirksames Gift enthält. Schwere, durch diese Art, hervorgerufene Vergiftungsfälle müssen, besonders bei Kleinkindern, ausser der Behandlung mit Analgetika und Sedativa, mit dem Anti-Skorpionserum des Institutes Butantan recht frühzeitig (innerhalb 15-30 Minuten spätestens) behandelt werden.

Die Mittelwert der Trockengiftmengen pro Extraktion wurden vergleichend dargestellt, wie auch die Wirkungsweise der verschiedenen Gifte auf die weissen Mäuse.

BIBLIOGRAFIA

Bücherl, W. — Mem. Inst. Butantan, S. Paulo, 25(1): 53-82; 1953 e 83-108; 1953.
Bücherl, W. — Arzneimittel-Forschung, 2: 68-72; 1955.

Mem. Inst. Butantan,
27:51-66. 1955/6.

NEMATOIDES (*Oxyuroidea*) PARASITOS DE DIPLÓPODOS DA ILHA DA QUEIMADA GRANDE, SÃO PAULO, BRASIL

JOSÉ M. RUIZ & ERMENGARDA COELHO
(*Secção de Parasitologia, Instituto Butantan*)

Os nematóides referidos na presente nota provêm de *Neptunobolus hogei* Schubart, 1949, por nós identificados.

Cerca de 40 exemplares de diplópodos foram examinados, lógo após seu recebimento, sendo constante a infestação por três espécies de nematoides, conforme passamos a descrever.

O material diplopodológico foi capturado pelo Sr. Alphonse R. Hoge em Setembro de 1953. Os nematoides foram estudados vivos e fixados em formol-acético.

DESCRIÇÃO

Aorurus agilis insularis var. n.

Fêmeas — Corpo cilindrico, atenuando-se para a extremidade anterior e bruscamente truncado ao nivel da região anal. Cauda longa e muito delgada. Cuticula com estrias transversais, largas. Lábios inconspícuos. Vestíbulo rudimentar. Aberturas anfidiais bem visíveis.

Esôfago relativamente curto, diferenciado em 3 porções bem distintas: uma porção anterior ou *corpus*, com base dilatada e arredondada, piriforme, uma porção média ou istmo, estreita, ligeiramente arredondada em seu contôrno externo e uma porção posterior representada pelo bulbo esofagiano, globóide, sub-piriforme, contendo um orgão triturador.

Intestino com base estreita, alargando-se logo a seguir, formando uma dilatação característica ao nível do poro excretor. A partir desse ponto estreita-se

Recebido, para publicação, em 25.III.1955.

progressivamente para a região posterior, terminando no ânus, na região truncada do corpo, sendo essa região envolta por várias células glandulares.

Anel nervoso situado um pouco à frente da região média do *corpus*.

Aparelho genital com a disposição semelhante ao tipo anfidelfo, porém, o ovijetor situa-se posteriormente e a vulva é contígua ao ânus (anfidelfia atípica). O ovijetor tem em seu conjunto a forma de Y cuja base é representada pela vagina que se diferencia do conjunto, por ser mais dilatada e de aspecto musculoso. Este conjunto é ventral ao intestino, assim como a vulva é ventral em relação ao ânus. O útero contém um número relativamente grande de ovos que não contêm ainda larvas diferenciadas. Ovos elipsóides, de casca delgada e transparente.

Machos — não observados.

Observação — Apesar de terem sido examinados cêrca de 40 exemplares de *N. hogei*, todos infestados por esta espécie, não foi observada a presença de machos.

DISCUSSÃO

Os dados dimensionais do nosso material, concordam com os de *A. agilis* segundo a descrição de Christie (1931-1938), exceto em dois pontos:

1 — posição do poro excretor
2 — comprimento da vagina

Em *A. agilis*, o poro excretor está situado ao nível da base do esôfago a cêrca de 0,22mm. da extremidade anterior. Em nosso material o poro excretor situa-se à distância média de 0,349mm. (material recentemente morto) e 0,292mm. (material conservado), da extremidade anterior, ou seja ao nível da dilatação do intestino. Essa dilatação máxima dá-se num nível mais posterior do que a observada na descrição e desenho de Christie.

Quanto ao comprimento da vagina, diz Christie: "The vagin extends anteriad about one-third the distance from the anus to the head, where it branches to form the two uteri". Em nosso material a vagina tem um comprimento total de cêrca de 0,215 a 0,370mm. (em média 0,271mm) ou seja cêrca de 1/5,7 do comprimento que vai do anus à extremidade anterior. A porção musculosa, ao contrário, é relativamente mais longa em nosso material, pois mede de 0,109 a 0,126mm. (em média 0,114mm), enquanto que Christie dá a medida de 0,09mm.

Dadas essas diferenças e considerando ainda a distribuição geográfica da espécie, julgamos estar em face de uma variedade para a qual propomos o nome de *insularis* var. n.

Aorurus agilis insularis var. n.

MEDIDAS TOMADAS DE EXEMPLARES EXAMINADOS ENTRE LÂMINA E LAMÍNULA

Dimensões em mm (fêmeas)	exemplares recentemente mortos por formól — acético						exemplares conservados					
	1	2	3	4	5	médias	1	2	3	4	5	médias
Comprimento total	3,15	2,94	3,26	3,20	3,34	3,17	2,49	2,57	2,70	2,55	2,47	2,56
Largura na região do bulbo	0,126	0,126	0,133	0,126	0,140	0,130	0,126	0,140	0,140	0,126	0,126	0,132
Largura na região média	0,267	0,281	0,288	0,281	0,295	0,282	0,267	0,281	0,323	0,225	0,253	0,270
Vestíbulo	0.009	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,015	0,012	0,012	0,009	0,012	0,012
Corpus comprimento	0,138	0,138	0,138	0,138	0,138	0,138	0,119	0,119	0,122	0,119	0,119	0,120
Corpus largura	0,065	0,084	0,084	0,084	0,065	0.076	0,078	0,075	0,084	0,069	0,072	0,076
Istmo comprimento	0,028	0,031	0,028	0,031	0,028	0,029	0,025	0,021	0,025	0,021	0,021	0,023
Istmo largura	0,034	0,031	0,031	0,031	0,031	0,032	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
Bulbo comprimento	0.103	0,106	0,103	0,103	0,103	0,104	0,087	0,094	0,100	0,094	0,097	0,094
Bulbo largura	0,097	0,103	0,100	0,094	0,100	0.099	0,087	0,087	0,097	0,078	0,087	0,087
Esôfago compr. total	0,269	0,275	0,269	0,272	0,269	0,271	0,231	0,234	0,247	0,234	0,237	0,237
Vagina comprimento	—	—	0,109	0,109	0,125	0,114	0,277	0,252	0,370	0,240	0,215	0,271
Cauda (ânus à extr. post.)	1,21	1,02	1,18	1,22	1,19	1,17	1,08	1,03	1,05	1,04	0,915	1,02
Distância do poro excretor à extr. ant.	—	0,351	0.308	0,357	0,382	0,349	0,308	0,269	0,320	—	0,271	0,292
Ovos	0,084 × 0.054	0,084 × 0,053	0,087 × 0,053	,09 × 0,056	0,086 × 0,053		0,084 × 0,053	0,094 × 0,050	0,094 × 0,063	0,078 × 0,050	0,078 × 0,050	
	0,087 × 0.056	0,087 × 0,053	0,086 × 0,056	0,084 × 0,054	0,081 × 0,063		0,087 × 0,054	0,091 × 0,053	0,087 × 0,051	0,087 × 0,056	0,081 × 0,050	
	0,084 × 0,053	0,087 × 0,053	0,084 × 0,053	0,087 × 0,053	0,084 × 0,056		0,087 × 0,056	0,087 × 0,053	0,087 × 0,053	0,081 × 0,053	0,081 × 0,050	

NOTA — Nos exemplares examinados imediatamente após a morte pelo formól — acético a vagina foi medida só na extensão de sua parte muscular.

Thelastoma bulhõesi dollfusi var. n.

DESCRIÇÃO

Fêmeas — Corpo cilíndrico, atenuado em ambas as extremidades. Cauda longa, extremamente afilada. Cutícula estriada transversalmente. Bôca com 3 lábios ligeiramente salientes. Vestíbulo curto.

Esôfago relativamente longo, com cêrca de um terço do comprimento do corpo (sem a cauda); consta de um corpus subcilíndrico, longo, regular, um istmo curto perfeitamente separado do corpus, porém em continuação com o bulbo esofagiano, de modo a dar a êste um aspecto piriforme no conjunto e um bulbo esofagiano amplo, com uma cavidade larga contendo o orgão mastigador, quitinizado.

Intestino muito largo no seu início, separado do esôfago por uma válvula esôfago-intestinal, trilobada; tem trajecto quase retilíneo afinando-se progressivamente à medida que se dirige para a extremidade posterior. Abertura anal próxima da base da porção afilada da cauda e circundada por células glandulares.

Anel nervoso situado no terço médio do corpus esofagiano.

Poro excretor situado um pouco à frente do istmo esofagiano, do mesmo lado que o ânus.

Aparelho genital anfidelfo, as fêmeas mais idosas contendo um grande número de ovos. Ovijetor dirigido para trás. Vulva pouco saliente situada mais ou menos no meio do comprimento total do corpo (inclusive cauda). Ovos intra-uterinos não apresentando larva bem desenvolvida; não elipsoides, de casca delgada e transparente.

Machos — não observados.

Observações — Foram examinados cêrca de 40 exemplares de *N. hogei*, todos infestados por esta espécie, apesar de que jamais foram encontrados os machos.

DISCUSSÃO

T. bulhõesi — foi descrito originalmente por Magalhães, 1900, de *Periplaneta americana* Fabricius, do Rio de Janeiro. Chitwood (1953) redescreveu a espécie que encontrou no mesmo hospedeiro nos Estados Unidos.

Dollfus identificou a esta espécie um exemplar fêmeo encontrado no intestino de diplópodo, *Gymnostreptus sp.*, procedente de Sta. Adélia, Est. de São Paulo, Brasil.

As descrições, medidas e figuras de Magalhães e Chitwood estão de acôrdo, com pequenas variações compatíveis com a mesma espécie.

As dimensões e figuras apresentadas por Dollfus, ao contrário, não con-

cordam plenamente em certos pontos, como por exemplo, o comprimento do esôfago e a posição do poro escretor. Segundo este autor o poro excretor está situado a 0,415mm da extremidade anterior, ao passo que Magalhães e Chitwood dão esta distância como 0,45 e 0,43mm respectivamente. A diferença absoluta dessas dimensões não é grande, mas quando comparadas com o comprimento do *corpus* esofagiano ou o comprimento total do esôfago, vamos ter o poro excretor numa situação relativa mais alta, o que aliás aparece na figura do autor. Quanto ao comprimento total do esôfago, Dollfus cometeu um erro expresso em sua tabela de medidas, onde assinala 0,535mm. Somando-se os comprimentos do *corpus* (0,505), do istmo (0,030) e do bulbo (0,110) teremos 0,645mm, o que aliás corresponde ao desenho comparado com a respectiva escala. Esse comprimento não pode corresponder à espécie de Magalhães.

Há outras diferenças, como por exemplo, o menor tamanho dos ovos, que permite considerar o especimen de Dollfus como uma espécie próxima ou no mínimo uma variedade de *T. bulhõesi*.

Tivemos em mãos abudante material de *T. bulhõesi* de baratas de São Paulo (Capital) e a nossa observação corresponde exatamente à descrição apresentada por Magalhães. Ao mesmo tempo trabalhamos com o material de diplópodos da Ilha da Queimada Grande, objeto do presente trabalho. Tivemos pois a oportunidade de compará-los em igualdade de condições e verificámos que são formas distintas embora muito próximas.

Nossos exemplares procedentes de diplópodos diferem dos de baratas pelos seguintes caracteres:

1 — média do comprimento do esôfago (0,520 e 0,447mm respectivamente);

2 — situação do poro excretor que aparece sempre acima do istmo esofagiano nos primeiros ao passo que, nos outros aparece invariavelmente ao nivel do bulbo esofagiano, como o representou Magalhães, embora na figura de Chitwood apareça numa posição intermediária;

3 — número de anéis cuticulares. Magalhães descreve pormenorizadamente este característico, não mencionado pelos demais, e que está perfeitamente de acôrdo com as nossas observações no material de *Periplaneta americana*. Assim foram encontrados da extremidade anterior até o poro excretor: 41 a 45 (48 a 52 seg. Magalhães); até a vulva: 142 a 153 (120 seg. Magalhães); e até o ânus: 189 a 201 (180 a 190 seg. Magalhães).

No material de diplópodo o número de anéis é sensivelmente menor: 42 a 47, 93 a 112 e 117 a 136 respectivamente. Em vista de tais diferenças acrescidas ainda da diversidade de hospedeiro julgamos acertado considerar as formas encontradas em *Neptunobolus hogei* Schubart, como uma variedade de *T. bulhõesi* à qual denominamos *Thelastoma bulhõesi dollfusi* var n. e que deve corresponder à forma examinada por Dollfus de *Gymnostreptus sp.* de Sta. Adélia, Estado de São Paulo.

Thelastoma bulhõesi dollfusi var. n.

MEDIDAS TOMADAS DE EXEMPLARES CONSERVADOS E EXAMINADOS ENTRE LAMINA E LAMÍNULA

Dimensões em mm (fêmeas)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	médias
Comprimento total	2,31	2,13	3,15	2,05	2,42	2,36	2,23	1,84	1,84	1,84	2,22
Largura na região do bulbo	0,154	0,154	0,140	0,140	0,168	0,154	0,140	0,140	0,140	0,140	0,147
Largura na região da vulva	0,168	0,168	0,211	0,211	0,267	0,211	0,168	0,154	0,153	0,197	0,194
Vestibulo	0,009	0,012	0,012	0,015	0,015	0,012	0,009	0,009	0,009	0,012	0,011
Corpus comprimeoto	0,493	0,296	0,586	0,401	0,339	0,444	0,382	0,339	0,345	0,481	0,411
Corpus largura	0,043	0,037	0,043	0,037	0,037	0,030	0,043	0,037	0,037	0,030	0,037
Istmo e bulbo comprimento	0,117	0,117	0,123	0,123	0,123	0,123	0,104	0,098	0,086	0,074	0,119
Bulbo largura	0,104	0,098	0,104	0,098	0,098	0,086	0,080	0,086	0,086	0,083	0,092
Esôfago comprimento total	0,610	0,413	0,709	0,524	0,462	0,567	0,487	0,438	0,431	0,555	0,519
Distância do anus à vulva	0,535	0,352	0,816	0,535	0,520	0,323	0,380	0,323	0,309	0,253	0,435
Vagina	0.172	0,246	0,197	0,141	0,252	0,135	0,166	0,178	0,117	0,160	0,176
Cauda (ânus à extr. posterior)	0,844	0,830	0,971	0,732	0,816	0,675	0,675	0,732	0,704	0,605	0,758
Distância do poro excretor à extr. anterior	0,493	0,357	0,542	0,419	0,327	0,450	0,401	0,308	0,333	0,438	0,407
Ovos	0,089 × 0,059	0,089 × 0,065	0,081 × 0,056	0,078 × 0,053	0,081 × 0,056	0,087 × 0,056	0,078 × 0,053	0,078 × 0,062	0,084 × 0,062	0,072 × 0,056	
	0,075 × 0,062	0,089 × 0,062	0,075 × 0,053	0,081 × 0,053	0,086 × 0,053	0,087 × 0,056	0,078 × 0,056	0,081 × 0,056	0,081 × 0,062	0,069 × 0,056	
	0,065 × 0,059	0,084 × 0,062	0,078 × 0,053	0,078 × 0,061	0,081 × 0,056	00,87 × 0,053	0,087 × 0,056	0,087 × 0,059	0,081 × 0,062	0,075 × 0,053	

TABELA COMPARATIVA DAS DIMENSÕES DE *THELASTOMA BULHÕESI* DADA PELOS DIVERSOS AUTORES

Dimensões em mm (fêmeas)	*T. Bulhõesi* Magalhães 1900	*T. bulhõesi* Chitwood 1933	*T. bulhõesi* Dollfus 1952	*T. bulhõesi* P. americana de S. Paulo	*T. bulhõesi dollfusi* var. n.
Comprimento total	2,71 (2,10-3,39)	2,28-264	2,78	2,21-2,68	1,84-3,15
Largura	0,30 (0,23 0,28)	0.188-0,273	0·255	0,197-0,281	0,154-0,267
Número de aneis outiculares (total)	180 a 190	——	—	159 a 201	117 a 136
Esôfago — comprimento total	——	0,463-0,594	0,645	0,413-0,475	0,413-0,709
Corpus	0,36-0,40	0,329-0,380	0,505	0,302-0,357	0,296-0,586
Bulbo	——	0,080-0,095	0,110	0,092-0,117	0,080-0,104
Distância do poro excretor à extr. ant.	0,45	0,430	0,415	0,431-0,481	0,308-0,542
Cauda (ânus à extremidade posterior)	0,78-0,81	0,720-0,920	0,920	0,844-0,985	0,605-0,971
Ovos	0,080-0,085 × 0,060-0,067	0,070-0,080 × 0,050-0,072	0,066-0 069 × 0,052-0,055	0,085-0,097 × 0,060-0,075	0,069-0,090 × 0,053-0,066

Dudekenia insularis sp. n.

DESCRIÇÃO

Corpo cilíndrico, alongado; extremidade anterior larga e arredondada, extremidade posterior atenuada, terminando em pronta aguda.

Cutícula lisa, exceto ao nível da região esofagiana, onde se apresenta finamente espinhosa ou pilosa. Lábios ligeiramente salientes. Vestíbulo rudimentar.

Esôfago relativamente curto, diferenciado em duas porções: uma anterior larga com uma ligeira chanfradura no primeiro terço e outra posterior ou bulbo, mais dilatada que a região anterior, contendo um aparelho mastigador.

Intestino largo, retilíneo, com a porção terminal diferenciada num reto sub-piriforme, terminando num anus ventral. Cauda muito curta e afilada em ambos os sexos.

Aparelho genital feminino tipicamente anfidelfo. Ovijetor a princípio dirigido para a frente e a seguir recurvando-se para trás. Vagina diferenciada, musculosa. Poro genital, ventral, situado mais ou menos na região equatorial. Útero contendo número relativamente grande de ovos, sem larva diferenciada. Ovos elipsóides, de casca transparente e delgada.

Aparelho genital masculino, simples, constando de um testículo, recurvado em *N*, situado na metade posterior do corpo, seguido de uma constrição mus-

culosa e de uma porção dilatada repleta de espermatozóides (vesícula seminal?), à qual segue-se o canal deferente, não tendo sido observada diferenciação num ducto ajaculador. Espiculos sub-iguais, relativamente curtos, de extremidades arredondadas, ligeiramente recurvados. A extremidade posterior do macho apresenta asas caudais pouco desenvolvidas.

Papilas caudais em número de 9 pares, sendo 4 pares preanais, 1 par adanal e 4 pares postanais. As papilas préanais são ben desenvolvidas, estando o 3.º e 4.º pares situados bem à frente do nivel da base dos espiculos. O 1.º e 2.º pares situam-se ao nivel da zona espicular. As papilas postananis se dispõem em fileiras convergentes, dando ao conjunto o aspecto de um *V* quando vistas de face (Fig. 11 e 12).

Dudekemia insularis sp. n.

MEDIDAS TOMADAS DE EXEMPLARES CONSERVADOS E EXAMINADOS ENTRE LAMINA E LAMÍNULA

Dimensões em mm (macho)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	médias
Comprimento total média	2,81	3,89	2,94	3,47	3,02	3,34	4,20	3,42	2,49	3,28	3,29
Largura na região média	0,168	0,225	0,154	0,154	0,154	0,197	0,225	0,211	0,183	0,197	0,187
Corpus comprimento	0,172	0,123	0,135	0,172	0,172	0,154	0,160	0,160	0,123	0,172	0,154
Corpus largura	0,086	0,092	0,080	0,092	0,104	0,092	0,092	0,098	0,092	0,098	0,092
Bulbo comprimento	0,11	0,086	0,086	0,11	0,104	0,092	0,092	0,093	0,086	0,104	0,096
Bulbo largura	0,123	0,129	0,117	0,129	0,123	0,129	0,135	0,129	0,117	0,135	0,127
Esôfago comprimento total	0,283	0,209	0,202	0,283	0,277	0,246	0,252	0,259	0,213	0,277	0,250
Cauda (ânus à extr. posterior)	0,113	0,141	0,125	0,141	0,109	0,109	0,131	0,128	0,119	0,109	0,122
Espiculos comprimento	0,191	0,229	0,191	0,226	0,213	0,248	0,226	0,213	0,244	0,194	0,217
Distância do anel nervoso à extr. anterior	0,053	0,065	0,043	0,056	0,053	0,065	0,072	0,062	0,056	0,065	0,059

Dudekenia insularis sp. n.

MEDIDAS TOMADAS DE EXEMPLARES CONSERVADOS E EXAMINADOS ENTRE LÂMINA E LAMÍNULA

Dimensões em mm (fêmeas)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	médias
Comprimento total	3,70	4,18	4,18	4,20	5,26	3,73	4,10	4,60	4,81	3,15	4,19
Largura na região da vulva	0,197	0,239	0,197	0,253	0,295	0,168	0,211	0,168	0,197	0,211	0,212
Corpus comprimento	0,141	0,148	0,154	0,178	0,191	0,154	0,154	0,135	0,185	0,172	0,161
Corpus largura	0,117	0,111	0,129	0,148	0,135	0,148	0,141	0,129	0,116	0,104	0,127
Bulbo comprimento	0,098	0,111	0,086	0,086	0,111	0,074	0,080	0,104	0,092	0,104	0,092
Bulbo largura	0,135	0,160	0,123	0,141	0,141	0,117	0,135	0,154	0,104	0,135	0,134
Esôfago comprimento total	0,240	0,259	0,240	0,265	0,302	0,228	0,234	0,240	0,277	0,327	0,261
Vagina	0,675	0,520	0,675	0,380	0,774	0,844	0,633	0,704	0,732	0,492	0,643
Distância entre anus e vulva	1,63	1,87	1,84	2,23	2,46	1,60	1,97	2,05	2,21	1,60	1,94
Cauda (ânus à extr. posterior)	0,183	0,197	0,211	0,197	0,183	0,197	0,168	0,168	0,225	0,197	0,192
Distância do anel nervoso à extr. anterior	—	0,062	0,069	0,069	0,075	0,062	0,062	0,047	0,075	0,062	0,065
Ovos	0,094 × 0,065	0,097 × 0,072	—	0,081 × 0,065	0,097 × 0,075	0,094 × 0,069	0,097 × 0,075	—	0,103 × 0,075	0,087 × 0,072	
	0,097 × 0,069	0,094 × 0,069	—	0,087 × 0,072	0,087 × 0,072	0,100 × 0,065	0,094 × 0,078	—	0,087 × 0,072	0,078 × 0,075	
	0,094 × 0,069	0,103 × 0,072	—	0,084 × 0,065	0,087 × 0,069	0,091 × 0,069	0,100 × 0,078	—	0,094 × 0,078	0,094 × 0,072	

TABELA DANDO AS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES DE *DUDEKENIA*.

	D. acuminata	*D. multipapillata*	*D. robusta*	*D. falcata*	*D. subulata*	*D. multispinosa.*	*D. brevicaudata*	*D. inermis*	*D. glabra*	*D. insularis* sp. n.
Comp. do macho	7,5mm (?)	5,7mm	3,9-4,1mm	4,7-5,5mm	5,8-7mm	2,58mm	2,34mm	4,47-5,23mm	6,35mm	2,49-4,2mm
Compr. da fêmea	7,5mm (?)	5,1mm	7mm (média)	5,4-7,4	5,4-7,4	3,73-3,52-2,65mm	2,2-3,81mm	5,89-6,9mm	4,724 (adulta) 3,425 (imatura)	3,15-4,6mm
Presença de espinhos cutilares	não referido	não referido	não referido	não referido	não referido	presentes	presentes	ausentes	ausentes	presentes
Tamanho dos espículos	não referido	0,41mm	0,325-0,330mm	0,11mm	0,69-0,73mm	0,16mm (de frente)	0,28mm (de frente)	0,24mm (de frente) 0,18mm (de lado)	0,093mm	0,191-0,248mm
Número de pápilas	8 pares	15 pares	9 pares	7 pares	9 pares	6 pares	17	23	(?)	9 pares
Disposição das pápilas (pares)	5 preanais 3 postanais	9 preanais 6 postanais	4 preanais 1 adanal 4 postanais	4 preanais 3 postanais	4 preanais 5 postanais	3 preanais 3 postanais	4 preanais uma mediana 4 postanais	4 preanais uma mediana 7 postanais	(?)	4 preanais 1 adanal 4 postanais
Asas caudais	não referido	não referido	não referido	não referido	não referido	presentes	rudimentares	presentes	não referido	presentes rudimentares
Cauda da fêmea	não referido	0,18mm	0,085-0,09mm	0,6-1,0	0,6-1,0	0,24-0,33	0.07	0,49-0,51mm	0,720 (adulta) 0,41 (imatura)	0,168-0,225mm
Ovos	não referido	0,102x0,08mm	0,07x0,08mm	0,069x0,053	0,069x0,053	0,078x0,054 0,075x0,062 0,072x0,058	0,081x0,064 0,080x0,052	0,076x0,056 0,072x0,059	0,098x0,086 0,101x0,089	0,081-0,101 x 0,065-0,078

Pelos caracteres acima citados *D. insularis* sp. n., se aproxima muito de *D. brevicaudata* e se diferencia desta espécie principalmente pelo número e disposição das pápilas caudais no macho e pela forma dos espiculos que em nossa espécie apresentam as pontas mais arredondadas e são desprovidos da "região machetada" refrida para a 1.ª espécie.

As fêmeas são difíceis de distinguir.

RESUMO

São descritas *Aorurus agilis insularis* var. n., *Thelastoma bulhõesi dollfusi* var. n. e *Dudekenia insularis* sp. n., parasitas intestinais de *Neptunobolus hogei* Schubart (*Diplopoda*) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil.

SUMMARY

Aorurus agilis insularis var. n., *Thelastoma bulhõesi dollfusi* var. n. and *Dudekenia insularis* sp. n., intestinal parasites of *Neptunobolus hogei* Schubart (*Diplopoda*), from Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil, are described in this paper.

BIBLIOGRAFIA

Artigas, P. T. — 1926 — Nematoides de invertebrados. *Bol. Biològico* 26: 97-110.

Artigas, P. T. — 1929 — Systematica dos nematoideos dos arthropodes — *Tese de* doutoramento — 113 pp. S. Paulo.

Artigas, P. T. — 1930 — Nematoides dos gêneros *Rhigonema* Cobb 1898 e *Dudekenia*, n. g. (Nematoda Rhigonemidae n. n.). *Mem. Inst. O Cruz* 24 (1) 19-30.

Chitwood, B. G. — 1932 — A synopsis of the nematodes parasitic in insects of the family Blathidae Zeit. f. Parasit.5 (1): 14-50.

Chitwood, B. G. and Chitwood, M. B. — 1933 — Nematodes parasitic in Philippine cockroaches *Phil: p. J. Sci.* 52(4): 381-392.

Christie, J. R. — 1931 — Some nemic parasites (Oxyuridae) of Coleopterous larvae. *J. Agric. Res. Wash.* 42(8): 463-482.

Christie. J. R. — 1938 — A redescription of *Thelastoma robustum* Leidy with comments on other species of the nematode family *Thelastomatidae. Proc. Helm. Soc. Wash.* 5(2) 65-67.

Dollfus, R. Ph. — 1952 — Quelques Oxyuroidae de Myriapodes. *Ann. Parasitologie H. e Amp.* 27(1-3): 143-236.

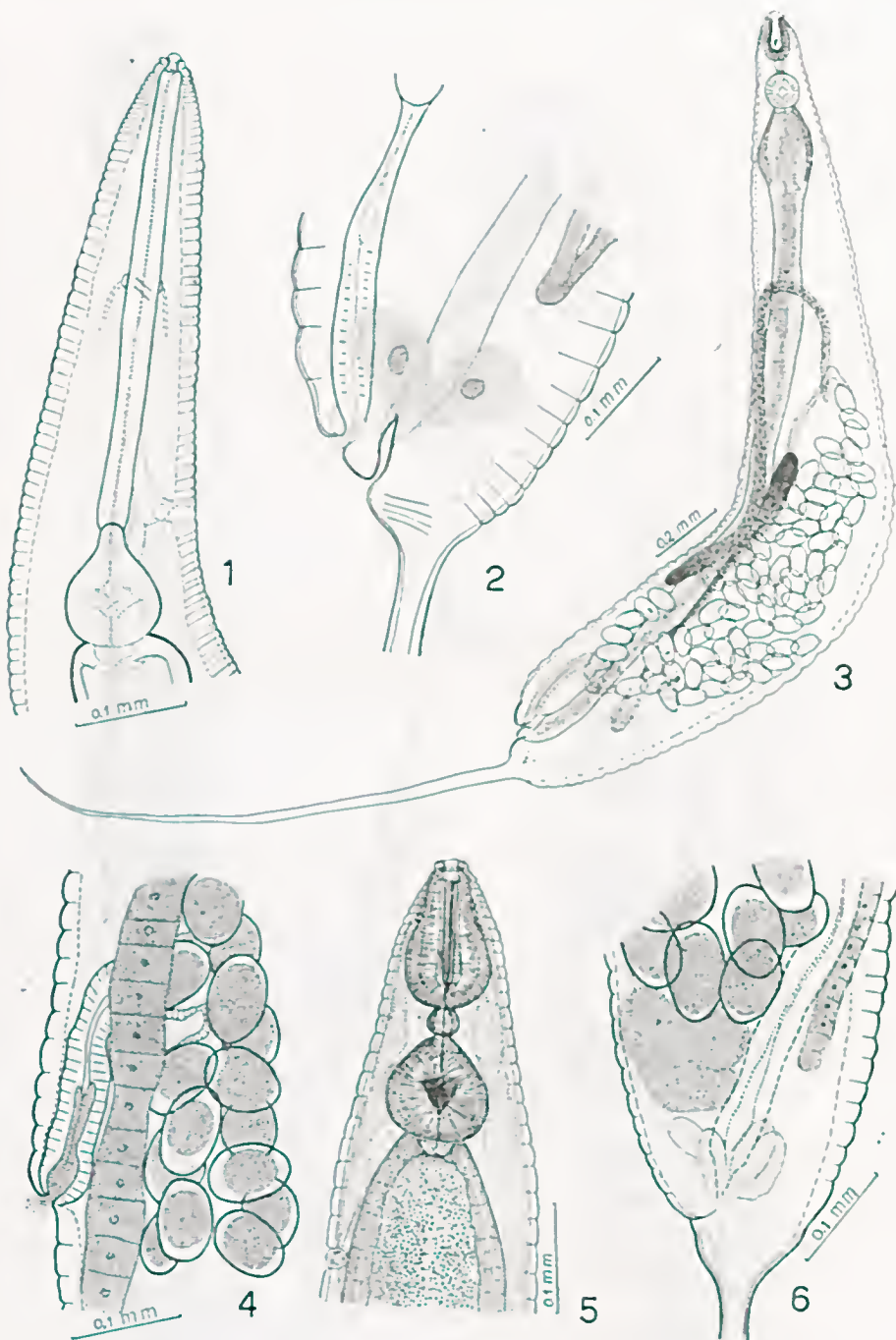
Magalhães, P. S. — 1900 — Notes d'helminthologie brèsilienne. 10 Materiaux pour servir à l'histoire de la flore et de la faune parasitaire de la *Periplaneta americana Fabr.* Une novelle espéce d' *oxyuris*: *O. Bulhõesi. Arch. Paras. Paris.* 3(1): 34-69.

Sanches, A. S. — 1947 — Nematodes parasitos intestinales de los artropodos em España. *Rev. Iberica de Paras.* 7(2): 279-332.

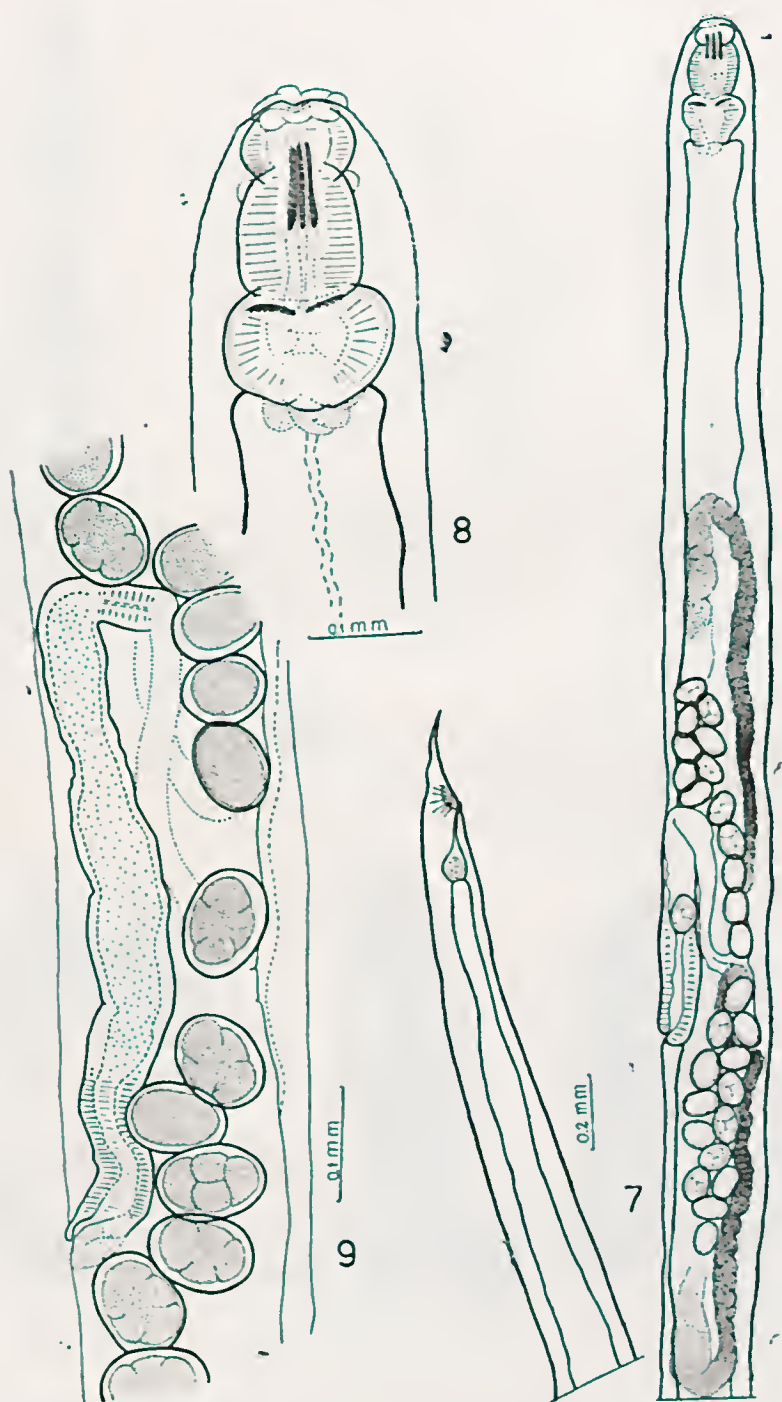
Shubart, O. — 1948 — Os Diplopoda de algumas ilhas do litoral Paulista. *Men. Inst. Butantan.* 21: 203-254.

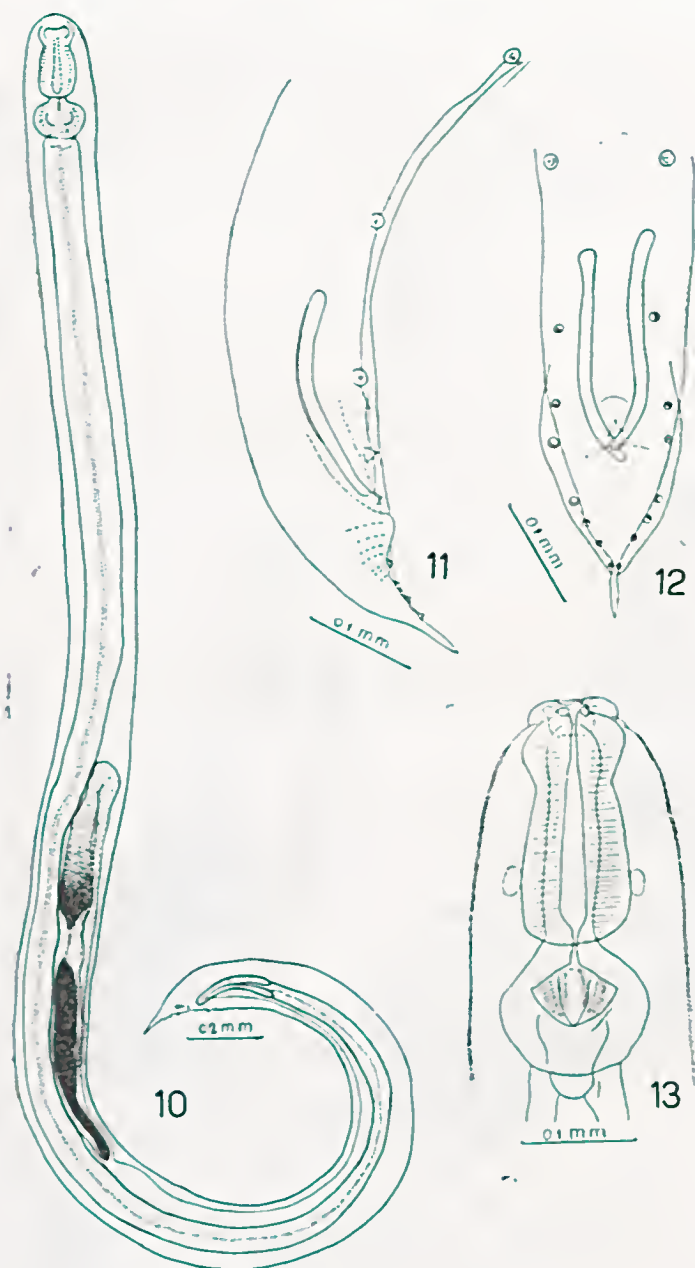
Shwenck, J. — 1926 — Fauna parasitologica dos blattideos do Brasil. *Scienia Médica.* 9: 491-504.

Travassos, L. — 1929 — Contribuição preliminar à systematica dos nematodeos dos arthropodos. *Mem. Inst. O. Cruz* Supl. pag. 18-25.

Walton, A. C. — 1927 — A Revision of the Nematodes of the Leidy Collections. *The Acad. Nat. Sci. Philadelphie.* 79: 49-161.

PRANCHA, I

Figs. 1, 4, 6, — *Thelastoma bulhõesi* var. *dollfusi* (fêmea) 1, pormenor da região anterior — 4, pormenor da região vulvar — 6, região posterior.

Figs. 2, 3, 5 — *Aorurus agilis* var. *insularis* (fêmea) 2, região posterior — 3, total — 5, região anterior. Desenhos em câmara clara.

PRANCHA, 2

Figs. 7 a 9. — *Dudekenia insularis* sp. n. (fêmea). 7 — total (2 partes) — 8 pormenor da região anterior — 9, pormenor da região vulvar. Desenhos em câmara clara.

PRANCHA, 3

Figs. 10 a 13, — *Dudekenia insularis* sp. n. (macho). 10 — total — 11, pormenor da região caudal, vista lateral. — 12, pormenor da região caudal, vista ventral, não representado o último par de pápilas. — 13, pormenor da região anterior. Desenhos em câmara clara.

PRANCHA 4

Fig. 14. — *T. bulhõesi* var. *insularis*, vista total de fêmea desenvolvida.
Fig. 15, — *A. agilis* var. *insularis*, visita total da fêmea.
Fig. 16, — *T. bulhõesi* var. *insularis*, vista total da fêmea pouco desenvolvida. Desenhos em câmara clara

UMA NOVA ESPÉCIE DE MICRURUS (SERP. ELAP.) DO BRASIL

A. R. HOGE
(Laboratório de Ofiologia, Instituto Butantan)

Recebemos em diferentes épocas, exemplares de *Micrurus* que nos chamaram a atenção pelo seu colorido e desenho diferentes. Depois de examinarmos os exemplares registrados na coleção do Instituto Butantan como *frontalis*, encontramos no meio dêstes, dois specimens com as mesmas características (No. 4802 e 6124). O número de exemplares que dispomos é de nove (9), número êste que achamos suficiente para elaborar uma diagnose.

Micrurus tricolor nov. sp.

Material: Tipo N.º 16290, ♂ procedente de Garandazal*, remetido por Odilon Lemos Alves, em 25/2/1955.

Paratipos: N.º 14297, ♀, e N.º 14298 ♂, procedentes de Guia Lopes*, remetidos por João Pedro da Silva, em 25/9/1952.

N.º 14299, ♀, procedentes de Taunay*, remetido pelo Departamento Florestal, em 25/9/1952.

N.º 14223, ♀, e 14253, ♂, procedentes de Taunay*, remetidos respectivamente em 27/7/1952 e 12/9/1952.

N.º 14567, ♂, procedente de Taunay*, remetido por Otavio Quirino, em 5/11/1952.

N.º 4802, ♀, procedente de Barranco Branco, remetido por Alvaro Garcia, em 20/7/1927.

N.º 6124, ♀, procedente de Taunay*, remetido por Candido Pires em 17/7/1931.

Diagnose: uma espécie de *Micrurus* com aneis pretos dispostos em triadas (8 a 10) no corpo e 1+1/3 na cauda; o primeiro anel da 1.ª triada é separado das parietais por 7 a 9 escamas vertebrais; o anel mediano das triadas é separado dos laterais por aneis brancos; 7 infralabiais, o primeiro par em contacto por detrás da sinfisial; 7 (3 e 4) supralabiais; ôlho pequeno, cêrca de 1,7 menor

* Localidades situadas no Estado de Mato Grosso, Brasil.

Recebido, para publicação, em 4.IV.1955.

do que a sua distância até a boca; a cabeça preta até as parietais inclusive; ventrais 218 a 231, sendo 224 a 229 nos ♂ ♂ e 218 a 231 nas ♀ ♀; anal dividida; subcaudais duplas 25 a 30 nos ♂ ♂ e 21 a 29 nas ♀ ♀; dentes palatinos 7; dentes pterigoides 4.

Descrição do tipo: focinho arredondado, levemente projetado para frente; rostral mais larga do que alta, visivel de cima; internasais mais curtas do que largas, muito menores do que as prefrontais, que são tão largas quanto longas; frontal mais longa do que larga, mais curta do que as parietais; parietais mais longas do que sua distância das internasais; nasal dividida, a posterior em contacto com a preocular; 1 preocular; 2 postoculares, sendo a inferior menor; temporais 1+1; ôlho pequeno, cêrca de 1,7 vezes menor do que sua distância da boca; 7 supralabiais (3 e 4), 6.ª maior e 7.ª bem desenvolvida apenas ligeiramente mais baixa do que a 6.ª, (Fig. 2); 7 infralabiais (4.ª maior); o primeiro par de infralabiais em contacto por detrás da sinfisial; as quatro primeiras infralabiais em contacto com a mentual anterior, que é mais curta do que a posterior; 224 ventrais; anal dividida; 29 subcaudais duplas.

Colorido e desenho: côr de fundo vermelha com 10 triadas pretas no corpo e 1+1/3 na cauda; o anel mediano de cada triada é maior do que os externos e separado destes por um anel branco de cada lado. Os aneis brancos das duas primeiras triadas são imaculados enquanto os outros têm algumas escamas dorsais com uma manchinha preta na ponta; os espaços vermelhos são menores do que as triadas e têm as pontas das escamas pretas. O primeiro anel da primeira triada começa na altura da 9.ª + 1/½ escama vertebral. A cabeça (Fig. 3) é preta em cima até os parietais inclusive; as suturas das placas cefálicas são marginadas de branco; as 5 primeiras supralabiais são pretas com algumas margens brancas, a 6.ª e a 7.ª são vermelhas com algumas manchas pretas; a sinfisial e algumas infralabiais são manchadas de preto (fig. 6).

Variações: em todos os exemplares o n.º de triadas na cauda é invariavelmente 1+1/3, a única variação no colorido consiste me maior ou menor número de pontas pretas nas escamas dos anéis brancos. As outras variações estão apresentadas na tabela I.

TAB. I

N°. da Coleção	14297 ♀	14298 ♂	14299 ♀	14253 ♂	14567 ♂	14223 ♀	6124 ♀	4802 ♀	Tipo 16290
Triadas	10	10	9	10	11	8	10	8	10
Ventrais	226	228	235	229	229	224	233	218	220
Subcaudais	21	25	24	27	30	22	29	23	29
n°. de vertebrais até o 1° anel	8	9	9	7	9	8	8	8	9+1/2

Comparações: *Micrurus tricolor* é a mais próxima de *Micrurus frontalis frontalis* (D. B. et D.) porém diferente desta e das outras subespécies de *frontalis* pela posição do primeiro anel da 1.ª triada, que é separado das parietais por 7 a 9 escamas vertebrais enquanto em *frontalis* se observa somente 1.ª a 3 escamas entre as parietais e o primeiro anel preto; pela presença de aneis brancos (Fig. 1 e 4); além disto o primeiro anel da primeira triada é sempre mais estreito em *frontalis*. (fig. 5).

Dentição: *Micrurus tricolor* tem 7 dentes palatinos e 4 pterigoides ao invés de 10 e 3 respectivamente em *M. frontalis*.*

ABSTRACT

Description of a new species of Micrurus, *Micrurus tricolor* nov. sp., from State Mato Grosso, Brazil.

Diagnosis: a coral snake with 8-10 triads on the body and 1+1/3 on the tail; the median ring of each triad separated from the outer by white rings; head black, parietals inclusive; the first triad separated from the parietals by 7-9 vertebral scales; 7 lower-labials the first in contact whith his fellow behind the symphysial; 7 (3-4) upper-labials; eye minute, his distance from the border of the mouth 1,7 x his diameter; ventrals 218-230, ♂♂ 224-229, ♀♀ 218-231; anal divided; subcaudals divided (21-30), ♂♂ 25-30, ♀♀ 21-29.

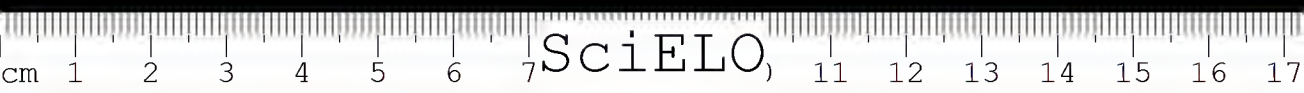
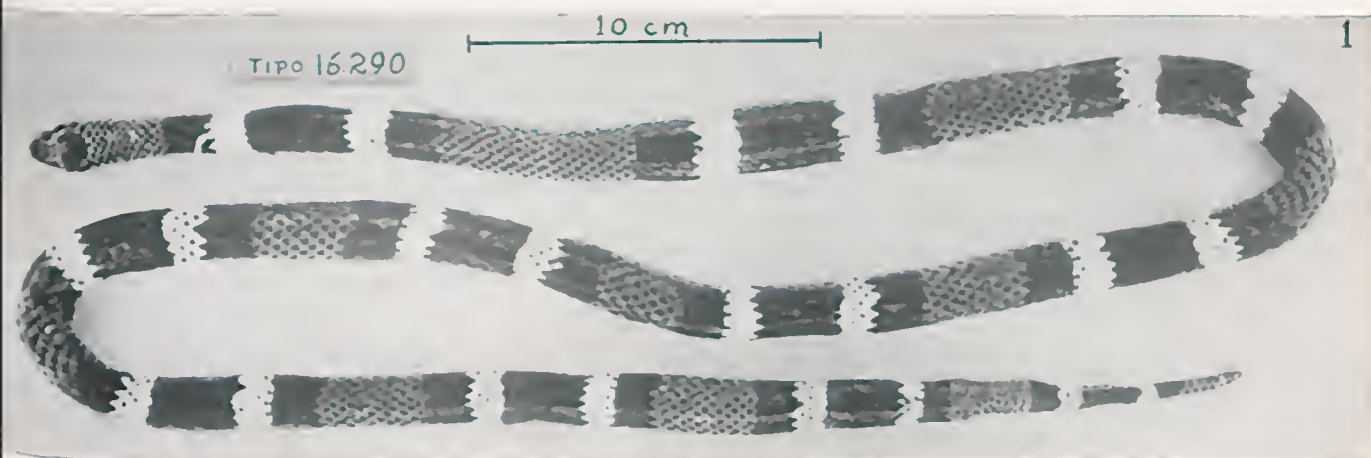
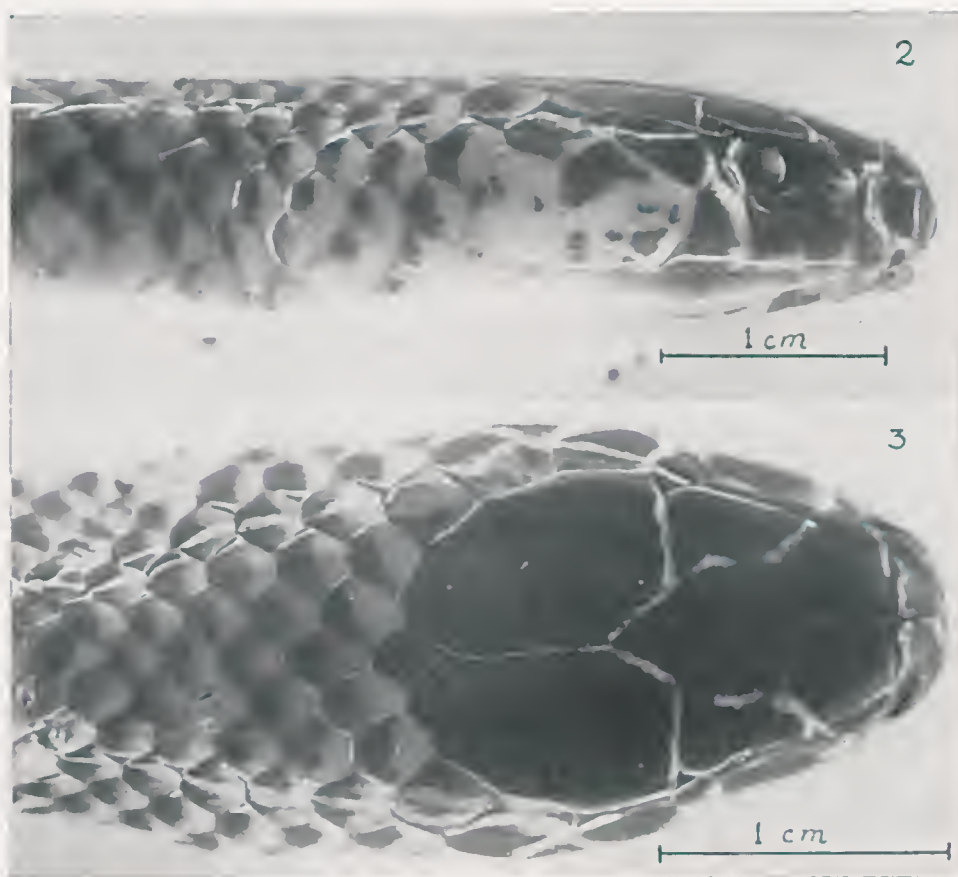
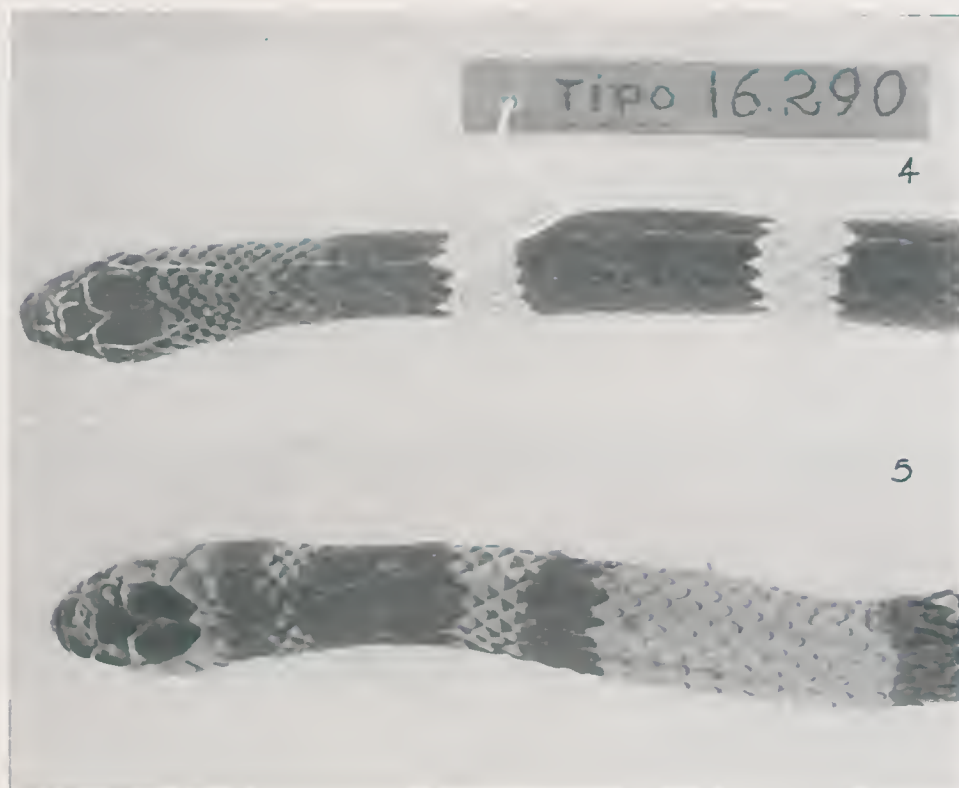
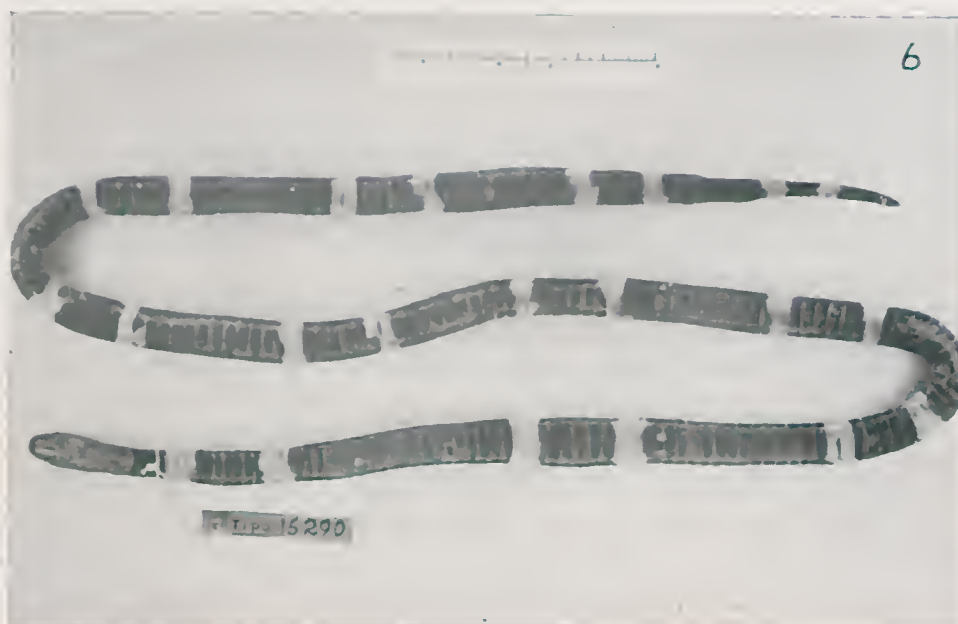
The new species is nearest to *Micrurus frontalis frontalis* (D. B. et D. 1854) but different from this one and other subspecies of *frontalis* by the position of the first triad (separated from the parietals by 7-9 vertebral scales instead of 1-3 in *frontalis* subspecies, by the white ring instead of white, yellowish powdered with dark: Furthermore the first ring of the first triad is constantly narrower in *frontalis* subspecies. *Micrurus tricolor* has 7 palatine and 4 pterigoid teeth instead of 10 and 3 respectively in *Micrurus frontalis*.

Variations: see table I where triadas = triads; ventrais = ventrals; subcaudais = subcaudals and n.º de vertebrais até o primeiro anel = number of vertebral scales between the parietals and first ring.

BIBLIOGRAFIA

Duméril, Bibron et Duméril — Erpetologie Générale 7: 1223, 1854.

---

* Em breve publicaremos uma nota preliminar sôbre as corais.

Micrurus tricolor, tipo (vista dorsal).

2 — *Micrurus tricolor* (vista lateral).
3 — *Micrurus tricolor* (vista dorsal).

4 — *Micrurus tricolor* (tipo).
5 — *Micrurus frontalis*

6 — *Micrurus tricolor*, tipo (vista ventral).

Mem. Inst. Butantan.
27:73-105. 1955/6.

OBSERVAÇÕES MISCELÂNEAS SÔBRE PEÇONHAS OFÍDICAS E ANTIVENENOS

W. H. A. SCHÖTTLER

(Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan)

No decorrer de extensa investigação sôbre as propriedades imunológicas das principais peçonhas botrópicas do Brasil e dos antivenenos a elas correspondentes, cujos resultados foram publicados em outra revista (30), fizeram-se numerosas observações e algumas pesquisas complementares, que não deviam ser incorporadas àquêle artigo por não se enquadrarem bem no tema aí debatido. Êstes achados e a sua significação são apresentados aqui, não só pelo possível interêsse para outros pesquisadores dêste campo, mas também porque se relacionam, em parte, com outras investigações sôbre venenos atualmente em andamento neste Instituto. Para os pormenores completos dos dados experimentais, confronte-se a publicação (30) acima mencionada.

REAÇÃO DE CAMUNDONGOS À INOCULAÇÃO PARENTERAL DO VENENO

Imediatamente após a injeção endovenosa de altas doses de veneno, os animais apresentam sinais de grande excitação, saltam e têm convulsões violentas, durante as quais certo número sucumbe em poucos minutos. Hemóptise abundante é bastante comum em tais casos. Outros animais entram em estado de coma profundo, no qual morrem no espaço de alguns minutos até algumas horas. Ainda outros camundongos se restabelecem do coma e, depois de passarem horas em aparente bem-estar, morrem mais tarde, ou sobrevivem definitivamente.

Em animais que receberam a peçonha por via subcutânea geralmente não se observam sintomas imediatos da intoxicação, afora certa inquietação. Então, conforme a severidade do envenenamento, torna-se manifesto colapso progressivo, do qual os animais raramente recuperam. Ao mesmo tempo começam a aparecer

Recebido, para publicação, em 25.V.1955.

hemorragias subcutâneas, com gangrena e necrose subseqüentes no local da injeção. Êste sintoma só, quando não acompanhado de colapso geral, não constitúi medida pela qual se deduza o prognóstico, pois camundongos com lesões locais muito extensas sobrevivem com bastante freqüência.

O comportamento e os sintomas observados nos animais eram iguais em seguida à inoculação de ambos os tipos de peçonha, excetuado sòmente o veneno de *jararacussu* L-7 por via subcutânea. Neste caso, cêrca de 10% dos animais que haviam recebido esta peçonha só ou combinada ao sôro antipeçonhento, e que tinham sobrevivido um dia no mínimo, desenvolveram exoftalmia unilateral, que atingiu enormes proporções. Em geral esta lesão se tornou perceptível 24 horas após a injeção do veneno e alcançou o máximo no segundo dia. Uns dias depois, o globo ocular afetado entrava em necrose (Fig. 1). A dissecção revelou, nos casos mais avançados, necrose caseosa do globo ocular e dos tecidos anexos. O exame histológico de um caso severo mostrou uma zona hemorrágica sob o epitélio da conjuntiva palpebral; um foco hemorrágico extenso na câmara anterior, sob a córnea e contornando o cristalino, e forte hiperemia do nervo óptico. Num outro caso havia hemorragia em todas as câmaras, anterior e posterior, e nos tecidos orbitários peri-oculares, invadindo os tecidos gorduroso e muscular estriado da órbita; intenso grau de vaso-dilatação em pré-estase; início de leucodiapedese em alguns vasos. Em casos de menor gravidade foram encontradas sòmente congestão e hemorragias peri-capilares. Êste fenômeno, não ligado à morte ou sobrevivência e atualmente sem explicação razoável, não foi observado quando se empregaram duas outras amostras da mesma peçonha.

A intensidade das reações locais determinadas pela injeção subcutânea dos venenos puros ou das misturas peçonha-antiveneno é representada na Tabela I. Deve ficar entendido que a divisão da escala continua da lesão local em cinco graus arbitrários é baseada apenas nas impressões pessoais do autor. Uma vez que os graus intermediários tinham de ser avaliados para menos ou para mais, para serem enquadrados neste esquema, sòmente devem ser consideradas significativas diferenças de ++ ou maiores.

A inspeção desta tabela revela que o grau da lesão local provocada pelas sete amostras de peçonha experimentadas não depende da toxicidade de um veneno, mas sim da quantidade absoluta de toxina inoculada. Assim, a LD_{50} do veneno *alternata* (15.80 mg/kg) está situada na zona de reações leves até médias ,enquanto que a da peçonha de *atrox* (80.99 mg/kg) se acha bem dentro da zona de destruição local mais severa de tecido. O fator hemorrágico dos venenos é neutralizado até certo grau por antivenenos tanto homólogos quanto heterólogos (dentro de um mesmo gênero). Não há, porém, congruência entre a neutralização das atividades locais destas peçonhas e a da sua toxicidade total, como é demonstrado pelo caso do veneno *cotiara* e seu anti-sôro específico.

DISCUSSÃO

A semelhança entre o quadro clínico do envenenamento ofídico e os sintomas que acompanham várias formas de choque já foi comentada por Essex & Markowitz (5), Moon (16) e outros, e é confirmada pelos achados de Witham *et al.* (37). Moon & Kennedy (17) mostraram que tecido muscular triturado e introduzido na cavidade peritoneal em dose de menos de 0.5% de pêso do corpo é suficiente para produzir choque fatal em cães. Estas e outras observações semelhantes de outros pesquisadores sugeriam o estabelecimento de uma ligação causal entre o extenso dano local provocado por numerosas peçonhas ofídicas (23-27) e o aparecimento de um colapso da circulação sanguina parecido com choque. Dêste modo, Schaumann (22) distinguiu dois princípios tóxicos em venenos de ação local, inoculados por via subcutânea, sendo um o fator tóxico pròpriamente dito, devido ao qual os animais morrem em 24 horas ou menos, e o outro o componente hemorrágico, que provoca "morte tardia", i. e., depois de mais de 24 horas, pela lesão severa dos tecidos no lugar da injeção ou, em outras palavras, por choque traumático. Tal distinção entre os dois mecanismos é, evidentemente, bastante arbitrária, pois é fato bem sabido que a morte por trauma local, tal como contusão muscular, queimaduras etc., tanto pode ocorrer dentro de poucas horas como levar até alguns dias depois da lesão, sendo igual o prazo de sobrevivência na morte pelo envenenamento por peçonhas ofídicas isentas de atividades locais, quer em animais de laboratório (24, 27) quer no homem (1). As observações desconcertantes de Schöttler (24), observando que animais com trauma local aparentemente severo freqüentemente não pareciam muito afetados, puseram em dúvida a importância do dano provocado pela peçonha no lugar da injeção. É bem possível que seja superestimada, pelo observador, a importância da destruição local de tecido e do edema sanguíneo, que raramente ultrapassa um terço da superfície do corpo em animais de pequeno porte. Por outro lado tem sido descrito com freqüência choque fatal resultante de lesões relativamente pequenas, o que também evidenciam as pesquisas de Moon & Kennedy (17).

O mecanismo do choque em geral ainda é assunto muito controvertido, e o do choque produzido pela inoculação subcutânea de venenos dotados de ação local, aliás a via mais comum de introdução da peçonha em casos de ofidismo, é ainda mais complicado pelos efeitos indiretos que a toxina pode provocar por essas mesmas reações locais. São, portanto, os seguintes os fatores que podem ser distinguidos no trauma local provocado por tais peçonhas:

a. *Produção de edema hemorrágico local, resultando num decréscimo de líquido no sistema circulatório.* Schwiegk & Schöttler (32) demostraram que o extravasamento de plasma para os tecidos, causado por trauma local, pode

ser suficientemente abundante para constituir por si mesmo a *causa mortis*. Todavia não é forçoso admitir a ocorrência de edemas tão grandes no caso de empeçonhamento, pois perdas muito menores de plasma são capazes de iniciar o círculo vicioso — Moon (16) e Schwiegk (31) — de colapso secundário induzido pelo decréscimo do volume de plasma ou sangue no sistema circulatório. Por outro lado, a intensidade de um trauma local não obriga a um grau correspondente de reação sistêmica. É possível que a ação destrutiva do veneno sôbre o tecido endotelial seja tão forte que, após um aumento inicial da permeabilidade capilar e perda conseqüente de líquido sanguíneo, a circulação seja completamente interrompida na área atingida devido à necrose dos vasos sanguíneos. Esta hipótese forneceria explicação aceitável à divergência entre a severidade aparente de reações locais e a mortalidade correspondente. Não obstante nada ser conhecido sôbre o mecanismo da ação local de peçonhas, exceto talvez que está provàvelmente associada à atividade proteolítica, a evidência experimental, especialmente a neutralização do fator hemorrágico por antiveneno sem alteração significativa da dose letal, parece indicar que o trauma local *per se* não contribui muito para a morte por envenenamento ofídico, salvo quando o peritônio for perfurado e os intestinos ficarem expostos (24).

b. *Libertação de substâncias farmacodinâmicamente ativas, normalmente celulares, e formação de produtos tóxicos conseqüente à desintegração de material inofensivo por várias ações enzímicas de venenos* (38). Feldberg & Kellaway (6, 7), Rocha e Silva *et al.* (21), Werle *et al.* (36) e demais pesquisadores têm demonstrado a libertação, ou formação, de histamina e outras substâncias depressoras por peçonhas. Nada, porém, parece ser conhecido sôbre as proporções nas quais estas substâncias aparecem e em que quantidades podem lesar o organismo. Na presente investigação em camundongos, a possível influência de histamina devia ser mínima, pois, segundo Dekanski (3), a injeção endovenosa de doses de histamina dez vezes maiores do que a existente no camundongo inteiro é tolerada quase sem sintomas por esta espécie animal notadamente resistente à histamina. O papel insignificante da histamina no ofidismo também pode ser deduzido da ineficácia terapêutica da medicação antihistamínica em tais experiências (29). A produção de hemorragia local não está necessàriamente ligada ao mecanismo que provoca a libertação, ou formação, de compostos tóxicos, como fica evidenciado pelo fato de que o mesmo também acontece com venenos que não causam sintomas macroscòpicamente perceptíveis no lugar da inoculação. Outrossim, tal atividade não fica necessàriamente limitada às imediações do local da injeção do veneno, podendo fazer-se sentir por todo o organismo, o que acontece, entretanto, com intensidade decrescente de reação. Ainda não foi verificado se, e até que grau, o princípio fisiológico tratado neste parágrafo pode ser neutralizado por soros antipeçonhentos.

É quase certo que as ações locais combinadas de venenos são devidas aos seus énzimos proteolíticos. Seria por isso interessante investigar a capacidade proteolítica de doses letais das peçonhas aqui estudadas. Infelizmente tais dados sòmente existem para o veneno de *B. jararaca*. Martirani & Azevedo (15) verificaram que esta peçonha digere gelatina na proporção de 1:83 até 1:1122 em 60 minutos e pH 8.0. O efeito letal da mesma espécie de veneno, relativamente a material sólido e admitindo que tres quartos do corpo do camundongo são constituidos por água, tem lugar na proporção de 1:29500 a 1:581400. Caso a digestibilidade das proteinas corporais fosse igual à da gelatina, isso significaria que uma dose letal da peçonha devia ser capaz de desintegrar 0.01 até 3.8% da substância do corpo. Lembrado que a destruição de menos de 0.5% pode ser suficiente para provocar a morte, é evidente que não pode ser contestada a importância da ação proteolítica de peçonhas em certo número de casos. A hipótese da existência de um fator comum no mecanismo do choque no envenenamento ofídico de um lado e, de outro lado, em numerosas formas de trauma mais ou menos localizado, é ainda mais reforçada pela semelhança dos achados histo-patológicos em ambos os casos. A possibilidade de que alterações tão disseminadas possam ser devidas ao efeito direto de doses letais tão insignificantes como as de peçonhas, parece muito remota, não obstante o veneno pode agir sôbre órgãos de alta susceptibilidade como, por exemplo, o sistema nervoso.

TEMPO DE SOBREVIDA À INJEÇÃO DE DOSES LETAIS DE PEÇONHA

O quadro do tempo de sobrevida após envenenamento fatal é apresentado na Tabela II, em cuja compilação não foram incluidas mortalidades por doses superiores às certamente letais. Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as duas vias da aplicação de veneno pode ser deduzida dêstes números, obtidos pelo registro da mortalidade em intervalos de 24 horas. Talvez, um exame mais detalhado do tempo da morte dentro do primeiro periodo de 24 horas depois da inoculação da peçonha, impraticável por motivos técnicos, tivesse revelado que a morte tem lugar mais ràpidamente após a injeção endovenosa.

Os prazos de morte dos animais nas experiências com soros antipeçonhentos acham-se registrados na Tabela III. A comparação dêstes algarismos com os obtidos com veneno só (Tabela II) mostra que não há diferença nas provas endovenosas e que a diferença das médias nas provas subcutâneas, embora não significativa, tende a indicar que o antiveneno retarda a morte em casos fatais. Dispostas as observações segundo os vários tipos de soros (Tabela IV), é interessante notar que os periodos de sobrevida se tornam mais regulares nas experiências subcutâneas, como evidencia o desvio padrão (σ) consideràvelmente

menor. Além disso, segundo esta disposição o mostra, a morte ocorre sem dúvida mais ràpidamente por injeção endovenosa do que pela subcutânea de misturas letais de veneno e antiveneno, como fica patente pelos algarismos correspondentes aos primeiros dois intervalos de 24 horas de registro.

TITULAÇÃO DE ANTIVENENOS MEDIANTE FLOCULAÇÃO E ENSAIO IN VIVO

Após incubação de misturas veneno-antiveneno durante uma hora a 37°C, a floculação se manifestava sòmente com o sôro antibotrópico B-114 digerido pela pepsina, enquanto que os outros antivenenos examinados neste trabalho e submetidos a outros métodos de purificação, ou talvez não purificados, não provocam o mínimo traço de turvação. Talvez o tempo de incubação fosse demasiado curto para a formação de um precipitado entre as peçonhas e estes últimos soros, uma vez que Hansen (10, 11) e Petermann & Pappenheimer (18) observaram que a digestão péptica diminúi muito o tempo de floculação de anti-toxinas, o que explicaria a floculação do sôro B-114.

Em nenhuma das pesquisas aquí mencionadas a neutralização das propriedades tóxicas das peçonhas coincidiu com a floculação máxima (Tabela V), o que confirma verificações anteriores sôbre êste assunto (28). Tais achados não são surpreendentes, pois, à luz das pesquisas de Pope *et al.* (19, 20) sôbre toxina e antitoxina diftéricas purificadas, nem mesmo teòricamente deve ser esperada relação direta entre ensaios in vivo e in vitro de antígenos tão complexos como os venenos ofídicos e os anticorpos correspondentes. De fato, Christensen (2) até observou que precipitados obtidos com proporções ótimas de veneno-antiveneno em certos casos não continham toxina alguma. Uma explicação plausível dêste fenômeno seria fornecida pelos toxoides de venenos de Githens & Butz (8) ou pelo grupo II do "Giftdrüsensekret" de Schöttler (24).

ORDEM DE TOXICIDADE E ÍNDICE SUBCUTÂNEO-ENDOVENOSO

A ordem de toxicidade dentro de uma série de venenos é obtida pelo cálculo da razão entre a dose mortal média de cada peçonha e da amostra mais ativa do grupo. Os resultados para os venenos usados nesta investigação encontram-se na Tabela VI. Da análise desta tabela parece deduzir-se que um veneno menos tóxico quando introduzido por via subcutânea se comporta como mais ativo quando a via empregada é a endovenosa, exceto o de *neuwiedii* L-10, que é fraco em ambos os casos. Esta influência da via de inoculação na inversão da ordem da toxicidade não ficou todavia estabelecida fora de qualquer dúvida, pois as zonas dos índices se sobrepõem em quase cada caso. Comparadas, porém, dire-

tamente as doses letais de espécies diversas de veneno, verifica-se, e. g., que a de *atrox* L-11 é superior à de *alternata* L-8 por via endovenosa, mas inferior por via subcutânea, havendo, como essa, 32 pares de combinações, não consideradas, naturalmente, as comparações entre diferentes amostras da mesma espécie de veneno. Esta comparação direta mostra que, em 9 casos, a relação entre duas peçonhas fica realmente invertida nos dois tipos de ensaio, e que não há um único caso estatisticamente significativo que forneça prova do contrário. A maior parte dos casos restantes, embora sendo estatisticamente duvidosos, depõe a favor da mesma constatação. O mesmo se verifica com referência ao índice subcutâneo-endovenoso, representado pelo quociente entre as doses letais médias subcutânea e endovenosa de uma peçonha. Não obstante os limites muito amplos dêste índice, as diferenças entre venenos por êle caracterizados são estatisticamente significativas no mínimo em 13 casos entre as 32 possibilidades de comparação.

A ordem de grandeza e as diferenças dos índices subcutâneo-endovenosos dos venenos em combinação com sôro antipeçonhento (Tabela VII) são menores do que os desses venenos sós (Tabela VI). Mesmo que as diferenças entre os índices das misturas veneno-antiveneno não sejam significativas, é interessante notar que as peçonhas com índice subcutâneo-endovenoso mais alto na prova de toxicidade — *atrox* L-11 e *jararacussu* L-7 — têm o índice mais alto também em combinação com sôro, e que, no ensaio endovenoso de antiveneno, é neutralizado um número consideràvelmente maior de doses letais dêstes dois venenos do que dos demais (30). Além disso nota-se que a combinação com o sôro anti-*cotiara* resultou em índice mais elevado em cinco das amostras de peçonha e num segundo e terceiro lugares uma vez cada.

DISCUSSÃO

Uma possível explicação para êstes achados podia ser fornecida pela observação mencionada acima, de que, em conseqüência da inoculação endovenosa da peçonha, os camundongos caem freqüentemente em choque imediato, do qual êles se recuperavam com rapidez para morrerem mais tarde, após horas de aparente bem-estar. Devido à natureza complexa dos venenos, não seria improvável que dois princípios tóxicos estivessem envolvidos no envenenamento endovenoso, um com ação direta sôbre os seus orgãos efetores, a cujo contato é levado pelo sangue, e outro que ou tem de sair da circulação para encontrar os seus receptores ou que precisa de tempo para liberar, ou formar, substâncias tóxicas dentro do corpo do animal ou que apresenta ao mesmo tempo as duas exigências. Na injeção subcutânea, o primeiro dêstes fatores estaria separado dos seus pontos de ataque por massas de tecido, de modo que a sua entrada na circulação

é retardada e gradativa, tornando-o relativamente inofensivo. Isto pode ser deduzido das pesquisas de Schaumann (22) e de Vellard & Huidobro (34), que observaram que a queda imediata da pressão sanguinea causada pela injeção endovenosa de peçonhas dotadas de ação local é menos severa, ou até ausente, quando da repetição da mesma dose, indicando a dessensibilização dos órgãos receptores para esta fração do veneno. Assim, um fator de grande importância no envenenamento endovenoso exerce menos, ou nenhuma, influência sôbre o resultado da introdução subcutânea da peçonha. Variações na distribuição quantitativa dêste fator nos venenos bem poderão ser responsabilizadas pela ordem invertida da toxicidade das peçonhas nas duas vias de inoculação.

Outra explicação foi oferecida por Martirani (14), sugerindo que diferenças na atividade hialuronidásica dos venenos poderiam determinar o grau da toxicidade subcutânea sem possuirem influência apreciável na inoculação endovenosa. A comparação das quantidades de hialuronidase existentes em doses letais das amostras de venenos sob investigação, tituladas pelo método de Tolksdorf *et al.* (33), (Tabela VI), mostra uma variação considerável da atividade hialuronidásica de doses de veneno que provocam a morte por injeção endovenosa, enquanto que as quantidades dêste énzimo contidas nas doses letais subcutâneas, bastante divergentes, são notàvelmente coincidentes. Isso justifica um exame mais aprofundado dêste assunto.

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA DOS VENENOS SÔBRE A TOXICIDADE SUBCUTÂNEA

O possivel papel da hialuronidase no envenenamento subcutâneo deveria tornar-se evidente se o titulo desta fôsse aumentado artificialmente, ou se a hialuronidase da peçonha fosse consumida pelo seu próprio substrato antes da injeção do veneno. Nestas pesquisas, um produto comercial de hialuronidase testicular bovina*, ou ácido hialurônico, foi adicionado para aquêle fim às soluções de veneno. As misturas foram incubadas a 37°C durante uma hora antes de serem injetadas em camundongos brancos fêmeos. Contrôles com as mesmas soluções de veneno mais salina foram realizados ao mesmo tempo. Os resultados estão registrados em Tabela VIII. O aumento em hialuronidase nas provas n.° 55, 56, 58 relativo aos contrôles n.° 34 ou 35, respectivamente, foi de 25, 18 e 72% nas doses letais médias. As quantidades de ácido hialurónico adicionadas às soluções de veneno nas provas n.° 57, 59, 60 eram suficientes para absorver 10720, 580 e 850% da atividade hialuronidásica dos contrôles relati-

---

* Fornecido, sob o nome comercial "Hyalozima" da Opoterapica NESPA Ltda., São Paulo, S. P., pela gentileza do dr. I. Martirani.

vamente às LD_{50}s. Os resultados destas pesquisas são bastante desconcertantes. As provas n.º 55, 56. 57 mostram que a redução da atividade hialuronidásica por grandes quantidades de ácido hialurónico diminúi significativamente a toxicidade da peçonha em comparação com a de soluções às quais fora adicionada hialuronídase. Justamente o contrário aconteceu nas pesquisas n.º 58, 59, 60, onde o ácido hialurónico aumentou a toxicidade relativamente à das soluções da peçonha enriquecida com hialuronidase, chegando num caso (prova n.º 58/60) o aumento a ser significativo sob o ponto de vista estatístico. Entrentanto, o êrro muito elevado dos ensaios de toxicidade nas provas de contrôle com veneno deixa transparecer que os resultados contraditórios surgiram provàvelmente por acaso. Dêste modo, não é possivel obter evidência alguma da influência da hialuronidase de peçonhas sôbre a toxicidade de venenos à luz dos resultados desta investigação. Resta a critica de que, segundo Haas (9) e Hechter (12), outros fatores além dos aqui considerados entram no mecanismo da difusão in vivo. Assim seria antecipada a conclusão de que a hialuronidase definitivamente não aumenta a toxicidade do veneno.

DISCUSSÃO

Na ampla literatura sôbre o fator, ou fatores, de difusão dos venenos, que é supostamente representado pela hialuronidase ou substância semelhante, foi geralmente aceito *bona fide* que um mecanismo que facilita a invasão de um organismo é favorável à ação de uma substância tóxica ou de outra maneira fisiològicamente importante. Certas verificações confirmam êsse ponto de vista tais como as observações de Krech (13), que achou que, em provas subcutâneas, é necessário muito menos antitoxina para neutralizar uma dose de toxina diftérica prèviamente injetada, se for adicionada hialuronidase ao sôro. Neste caso, a hialuronidase acelera a difusão da antitoxina através do organismo numa proporção que, sem o auxílio do ênzimo, sòmente doses maiores de sôro podiam alcançar. O fator tempo, porém, não tem importância alguma no envenenamento ofídico em circunstâncias naturais, pois é inteiramente indiferente que a serpente mate a sua prêsa em 5 ou em 30 minutos. Além disso há outro aspecto do problema da difusão no caso de peçonhas com atividade local pronunciada, que é o da concentração limiar do veneno necessária para vencer a resistência natural dos tecidos contra a sua ação. É óbvio que quanto maior a concentração de hialuronidase em certa quantidade de veneno, tanto mais ràpidamente êste se difunde e, por conseqüência, se dilúi na direção do nível critico, abaixo do qual não há mais dano local. Desta maneira, o efeito final da hialuronidase do veneno poderá ser exatamente o oposto do que se pensa em geral.

Parece inútil uma discussão destas possibilidades desconcertantes antes de conhecer mais sôbre os fatores essenciais do mecanismo fisiológico letal das peçonhas. Apesar da experimentação aqui relatada ter falhado no objetivo de provar a importância do fator de difusão no evenenamento botrópico, não deixa de ser verdade que uma investigação mais aprofundada do assunto, utilizando também outros tipos de veneno, poderá dar resultados interessantes que venham talvez contribuir para a melhor compreensão destas substâncias. Em benefício da terapêutica do ofidismo, tais pesquisas deviam ser extendidas também às reações entre antiveneno e hialuronídase. Isso não será tarefa fácil, pois, devido à natureza protéica dos soros, a sua influência sôbre a hialuronídase dificilmente pode ser pesquisada turbidimètricamente (33). Por outro lado, a interpretação de ensaios viscosimétricos (9) será dificultada pelas reações simultâneas entre fatores distintos, que influenciam a viscosidade do sistema apurador de maneiras diferentes e independentes: viscosidade do ácido hialurónico; viscosidade do sôro antipeçonhento; despolimerização do ácido hialurónico pelo veneno; inibição inespecífica (9) e neutralização específica (4) da hialuronidase da peçonha pelo antiveneno; ação proteolítica, e, por isso, redutora da viscosidade, do veneno sôbre o sôro, e alteração da tensão superficial pela peçonha (35) se o fator responsável por êste fenômeno for diferente dos já mencionados.

O autor agradece ao dr. M. de F. Amorim, professor de anatomia patológica da Escola Paulista de Medicina, pelo diagnóstico dos cortes histológicos, e ao dr. I. Martirani, do Departamento de Saúde e Assistência Social do Estado de São Paulo, pela titulação da hialuronidase nos venenos.

RESUMO

Êste artigo apresenta uma série de observações e pesquisas suplementares, executadas ao mesmo tempo que uma investigação extensa sôbre venenos botrópicos e os seus antivenenos, já publicada numa outra revista (30).

É descrita uma lesão ocular unilateral em camundongos, causada pela injeção subcutânea de certa amostra de veneno de *Bothrops jararacussu*.

A severidade das reações locais provocadas pela inoculação subcutânea de peçonhas depende da dose e não da toxicidade geral dos venenos. Elas são neutralizadas até certo grau por antivenenos específicos com referência à espécie e ao gênero de ofidio. A neutralização da atividade local e da toxicidade total ocorre em proporções diferentes. A significação do dano local no ofidismo é amplamente discutida.

São determinados os tempos de sobrevivência de camundongos após inoculações endovenosas e subcutâneas de doses letais de veneno sem e com adição de soros antipeçonhentos.

Não há relação entre a titulação *in vivo* e por floculação dos antivenenos.

A ordem de toxicidade dos venenos estabelecida pela prova endovenosa em geral é inversa da obtida pela inoculação subcutânea, o que resulta em índices subcutâneo-endovenosos diferentes nas várias espécies de peçonhas dentro do mesmo gênero ofídico. Como explicação dêste fenômeno é discutida a possibilidde de um mecanismo duplo na morte causada por peçonhas.

Não foi observada influência alguma da hialuronídase sôbre a toxicidade subcutânea dos venenos.

MISCELLANEOUS OBSERVATIONS ON SNAKE VENOMS AND ANTIVENINS

W. H. A. SCHÖTTLER

(Department of Pharmacology, Instituto Butantan)

In the course of an extensive study of the immunological properties of the principal *Bothrops* venoms of Brazil and their corresponding antivenins, the results of which have been published elsewhere (30), numerous observations and some supplementary experiments were made, which could not be incorporated in that paper because they do not directly pertain to its subject. These findings and their significance are reported here apart as they may not only be of interest to other workers in this field but, partly, also have a bearing on further venom research now in progress in this Institute. For full details of the experimental data, on which part of the present study is based, the reader is referred to the above mentioned publication (30).

REACTION OF MICE TO PARENTERALLY APPLIED VENOM.

Immediately after intravenous injection of higher doses of venom, the animals showed signs of great irritation, jumped wildly around and had violent convulsions, during which part of them succumbed within a few minutes. Abundant hemorrhage from the lungs was rather common in such cases. Other animals entered in a state of deep coma, in which they died after some minutes to several hours. Still other mice recovered from the coma and, after hours of apparent well-being, died later on, or survived ultimately.

No immediate symptoms of intoxication, except a certain restlessness, were generally observed in animals in which the venom had been injected subcutaneously. Then, progressive collapse according to the severity of the intoxication

---

Received for publication on 25. v. 1955.

became manifest, from which the animals rarely recovered. At the same time, development of subcutaneous hemorrhage with subsequent gangrene and necrosis at the site of injection set on. However, this symptom alone, if not accompanied by general collapse, is no measure by which the fate of the animals can be predicted, as mice with very extensive local damage survived rather often.

After both types of venom inoculation, behavior and symptoms of the animals were alike independent from the species of venom administered, with the only exception of the venom sample *jararacussu* L17 on subcutaneous injection. Here, about 10% of the animals, which received this venom alone or in combination with antivenin and survived at least one day, developed unilateral exophthalmus, which attained enormous proportions. This lesion was generally distinguishable 24 hours after venom injection and reached its maximum on the second day. A few days later, the affected eye-ball necrotized (Fig. 1). In the most advanced stages, dissection revealed caseous necrosis of the eye-ball and surrounding tissues. Histological examination of another severe case showed a hemorrhagic zone under the epithelium of the palpebral conjunctiva, an extensive hemorrhagic focus in the anterior chamber, under the cornea and around the lens, and pronounced hyperemia of the optic nerve. In a further case, there was present hemorrhage in the entire anterior and posterior chambers and in the periocular orbital tissues, extending to the adipose tissue and the striped muscles of the orbit; a high degree of vasodilation, and beginning diapedesis of leucocytes in some vessels. In light cases, only congestion and smaller perivascular hemorrhages could be distinguished. The phenomenon, which was not related to death or survival and for which no reasonable explanation can be offered at present, was not observed with two other samples of the same species of venom.

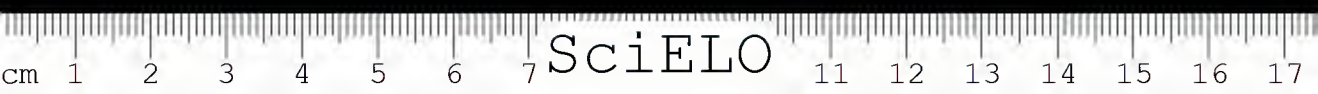
The intensity of the local reactions elicited by subcutaneous injection of the venoms alone and of the venom-antivenin mixtures is recorded in Table I. It must be understood that the division of the continuous scale of local damage in five arbitrary degrees is based on the personal impressions of the author only. As intermediate subdegrees were liable to be under- or overrated in order to be placed within the scheme, only differences of ++ or more may be considered significant.

Inspection of this table reveals that the degree of local damage provoked by the seven venom samples under investigation does not depend on the toxicity of a venom but on the absolute amount of toxin administered. Thus, the LD_{50} of the *alternata* venom (15.80mg/kg) is situated in the zone of light to medium local reactions, whereas that of the *atrox* venom (80.99 mg/kg) is deep in the region of severest local tissue destruction. The hemorrhagic factor of the venoms in neutralized to a certain degree by homologous as well as heterologous (but genus-specific) antivenins. However, there is no congruence

between the neutralization of the local activities of these venoms and that of their total toxicity, as demonstrated by the case of the *cotiara* venom and its specific antiserum.

DISCUSSION

The resemblance of the clinical features of snake poisoning to the symptoms which accompany various forms of shock has been commented on by Essex & Markowitz (5), Moon (16) and others and is confirmed by the findings of Witham et al. (37). Crushed muscle tissue in a quantity of less than 0.5% of the bodyweight and introduced in the peritoneal cavity has been shown by Moon & Kennedy (17) to be sufficient to produce fatal shock in dogs. These and similar observations by other authors made the establishment of a causal connection between the extensive local damage wrought by numerous snake venoms (23 — 27) and the appearance of a shock-like collapse of the blood circulation very suggestive. Thus, Schaumann (22) distinguished two toxic principles in locally active venoms inoculated subcutaneously, one being the properly toxic factor, to which the animals succumb in 24 hours or less, and the other the hemorrhagic component, which causes "late deaths", i. e. after more than 24 hours, by the severe damage of tissues at the site of injection or, in other words, by traumatic shock. This separation of the two mechanisms is, of course, rather arbitrary, for it is a well-known fact that death from local trauma, such as muscle contusion, burns, etc., may ensue in from a few hours to several days, but the survival time before death on intoxication with snake venoms devoid of local activity falls in the same range in laboratory animals (24, 27) as well as in man (1). The disconcerting observations of Schöttler (24), namely that animals with seemingly severe local trauma often did not appear very much affected, cast some doubt on the importance of the damage induced by venom at the site of injection. It is well possible that the local destruction of tissue and the formation of sanguineous edema, which may hardly exceed one third of the body surface of small animals, is greatly overestimated by the observer. On the other hand, it has been frequently reported that fatal shock may result from relatively small injuries, as also evident from the experiments of Moon & Kennedy (17).

The mechanism of shock in general is still a highly disputed matter, and that of shock by locally active venoms given subcutaneously, by the way the most frequent route of venom introduction in snake bite accidents is further complicated by the indirect effects the toxin may elicit through local reactions. Thus the factors which may be involved in the local trauma produced by poisoning with such venoms, are:

a. *Production of local hemorrhagic edema resulting in a decrease of fluid in the circulatory system.* Schwiegk & Schöttler (32) have demonstrated that the loss of plasma into the tissues caused by local trauma may be voluminous enough to constitute by itself the causa mortis. However, it is not necessary to assume such large edemas in the case of venoms, as much smaller losses of plasma are capable of starting the circulus vitiosus (Moon (16) and Schwiegk (31)) of secondary collapse induced by generalized internal loss of plasma or blood. On the other hand, the intensity of a local trauma does not warrant a corresponding degree of systemic reaction. It is possible that the destructive action of venom on the endothelial tissues is so strong that, after initial increase of capillary permeability with consequent leakage of blood fluid, the circulation is entirely interrupted in the affected area due to necrosis of the blood vessels. This assumption would supply an acceptable explanation of the incongruity between the apparent severity of local reactions and the respective rates of mortality. Though practically nothing is known about the mechanism of local venom action, except that it is probably associated with the proteolytic activity, the experimental evidence, especially the neutralization of the hemorrhagic factor by antivenin without significant alteration of the lethal dose, tends to indicate that the local trauma per se does not greatly contribute to death by snake poisoning, unless the peritoneum is perforated and the guts are exposed (24).

b. *Liberation of pharmacodynamically active substances, which are normally cell-bound, and formation of toxic split-products from inoffensive material by the various enzymic actions of venoms* (38). Feldberg & Kellaway (6, 7), Rocha e Silva et al (21), Werle et al. (36) and other workers have shown the release, or formation respectively, of histamine and other depressor substances by venoms. Nothing, however, seems to be known of the proportions at which these substances appear and in which amounts they might affect the organism. In the present investigation on mice, the possible influence of histamine should be irrelevant because, according to Dekanski (3), the intravenous injection of histamine doses ten times larger than exist in the whole mouse is tolerated by this notably histamine-resistant animal species with scarcely any discomfort. The insignificant rôle of histamine in snake poisoning is also evident from the therapeutic ineffectiveness of antihistamine medication in such experiments (29). The production of local hemorrhage is not necessarily coupled to the mechanism which brings about the liberation, or formation, of toxic compounds, as evident from the fact that the latter also occurs with venoms which do not provoke macroscopically perceptible symptoms at the site of inoculation. Furthermore, such an activity need not be limited to the immediate surroundings of the venom deposit but may spread throughout the whole body along with the absorption of the venom, although with decreasing intensity of reaction. If and

to what degree the physiologic principle treated in this paragraph is neutralized by antivenin has not yet been assayed.

It is almost certain that the combined local actions of venoms are associated with their proteolytic enzymes. Therefore it is interesting to investigate the proteolytic capacity of lethal doses of the venoms under consideration. Unfortunately, pertinent data were only available for the venom of *B. jararaca*. Here, Martirani & Azevedo (15) found that this venom digests gelatin in 60 minutes at pH 8.0 in a proportion of from 1:83 to 1:1,122. The lethal effect of the same species of venom, relative to solid material under the assumption that three fourths of the mouse body are water, occurs at a ratio of from 1:29,500 to 1:581,400. If the digestibility of the body proteins were equal to that of gelatin, this would mean that a lethal dose of venom should be capable of splitting 0.01 to 3.8% of the body substance. Recalling that the dissolution of less than 0.5% may suffice to provoke death, it is evident that the importance of the proteolytic action of venoms in quite a number of cases cannot be denied. The supposition of a common factor at least for part of the mechanism contributing to shock in snake poisoning on one side and in numerous forms of more or less localized trauma on the other is further supported by the similarity of the histo-pathologic findings in both conditions. The possibility that such wide-spread alterations may be due to the direct effect of the extremely minute lethal doses of venom appears rather remote, although the latter might and probably will directly interfere with selected organs of higher susceptibility as, for instance, the nervous system.

SURVIVAL TIME AFTER INJECTION OF LETHAL VENOM DOSES

A survey of the survival time after fatal intoxication is given in Table II, in the compilation of which mortalities at dose levels above the certainly lethal one were not included. No statistically significant difference between the two routes of venom application can be deduced from these figures, which have been obtained by recording the mortality rate at 24 hour intervals. A more detailed investigation of the times of death within the first 24 hour period after venom inoculation, which was technically impossible, might have revealed that death ensues more rapidly after intravenous injection.

The death times of the animals in the antivenin assays are recorded in Table III. A comparison of these figures with those obtained with venom alone (Table II) shows that there is no difference in the intravenous tests and that the difference of the means in the subcutaneous experiments, though not significant, tends to indicate that antivenin retards death in fatal cases. If the observations are arranged after the various types of antivenin (Table IV), it

is interesting to note that the periods of survival become more regular in the subcutaneous tests as evident from the considerably smaller standard deviation (σ). Furthermore, after this arrangement death ensues definitely faster on intravenous than on subcutaneous injection of lethal venom-antivenin mixtures, which is obvious from the figures of the first two 24 hour recording intervals.

ANTIVENIN TITRATION BY FLOCCULATION AND BIOASSAY

After incubation of venom-antivenin mixtures for one hour at 37° C, flocculation occurred only with the pepsin digested antibothropic serum B-114, whereas the other antivenins, which were investigated in the present study and which had been treated by other purificatory procedures or, perhaps, had not been processed at all, did not show the slightest trace of turbidity. It is possible that incubation was too short for the formation of a precipitate of the venoms and the latter sera, as Hansen (10, 11) and Petermann & Pappenheimer (18) have observed that peptic digestion greatly decreased the flocculation time of antitoxin.

In none of the experiments here referred to, maximum flocculation coincided with the neutralization of the toxic properties of the venoms (Table V), which confirms previous observations on this subject (28). Such findings are not surprising as, in the light of the research on purified diphtheria toxin and antitoxin by Pope et al. (19, 20), congruence between in vivo and in vitro assays of so highly complex antigens as snake venoms and their corresponding antibodies cannot even be expected in theory. As a matter of fact, Christensen (2) even observed that floccules obtained at optimal venom: antivenin ratios contained no toxin at all in certain cases. A plausible explanation of this phenomenon would be supplied by the venom toxoids of Githens & Butz (8) or group II of the "Giftdrüsensekret" of Schöttler (24).

ORDER OF TOXICITY AND SUBCUTANEOUS-INTRAVENOUS INDEX

The order of toxicity within a series of venoms is obtained by calculating the ratio between the mean lethal dose of each venom and that of the most active sample in the series. The respective figures for the venoms used in the present investigation ar given in Table VI. The inspection of this table demonstrates that the more active a venom is on intravenous injection the less toxic it seems to be if administered subcutaneously, with the exception of *neuwiedii* L-10, which is weak in either case. This reversed order of toxicity depending on the route of injection is admittedly not established beyond doubt, as the

ranges of the indices overlap in nearly every instance. However, if the mean lethal doses are directly compared, e. g. *atrox* L-11 is superior to *alternata* L-8 on intravenous and inferior on subcutaneous injection, 32 pairs of combination are possible, leaving out, of course, the comparison between different samples of the same species of venom. This direct comparison shows that in 9 cases the relation between two venoms is definitely reversed in the two types of assay and that there is not one statistically tenable case to supply evidence of the contrary. The greater part of the remaining cases, though dubious in a statistical sense, is favorable for the indicated observation. The same is true with regard to the subcutaneous: intravenous index, which is the quotient between the subcutaneous and the intravenous mean lethal doses of a venom. In spite of the very wide ranges of this index, the differences between venoms characterized by it are statistically significant in at least 13 cases out of the 32 possibilities of comparison.

Magnitude and differences of the subcutaneous: intravenous indices of the venoms combined with antivenin (Table VII) are smaller than those of the venoms alone (Table VI). Though the differences between the indices of the venom-antivenin mixtures are not significant, it is interesting that the venoms with the highest subcutaneous: intravenous index in the toxicity test — *atrox* L-11 and *jararacussu* L-7 — have also the highest index in combination with antivenin and that, in the intravenous antivenin assay, considerably more lethal doses are neutralized of these two venoms than of the others (30). It is further noteworthy that the combination with the anti-*cotiara* serum resulted in the highest subcutaneous: intravenous index in five of the venom samples and in second and third highest once each.

DISCUSSION

A possible explanation of these findings might be supplied by the aforementioned observation that on intravenous venom inoculation the mice frequently enterd in immediate shock, from which they soon recovered but, after hours of apparent well-being, died later on. By the complex nature of venoms it would not be unlikely that two toxic principles are involved in intravenous poisoning, one which acts directly on its effector organs, in immediate contact with which it is brought by the blood stream, and another which either has to leave the circulation in order to encounter its receptors or/and which needs time to liberate, or form, toxic substances within the animal body. On subcutaneous injection, the former factor would be barred from its points of attack by masses of tissue so that its entrance in the circulation is delayed and gradual, thus rendering it relatively harmless. The latter may be concluded from the

experiments of Schaumann (22) and Vellard & Huidobro (34), who observed that the immediate fall of blood pressure caused by intravenous injection of locally active venoms is less severe or even absent on replication of the same dose, which indicates a desensitization of the effector organs to this fraction of the venom. Hence, a factor of great importance in intravenous poisoning has less or no bearing on the outcome of subcutaneous venom application, and variations in the quantitative distribution of this factor in the venoms might well account for the reversed order of toxicity of the venom samples in the two routes of inoculation.

Another explanation was offered by Martirani (14), who suggested that differences in the hyaluronidase activity of the venoms might determine the degree of the latter's toxicity on subcutaneous injection but might be of negligible influence in intravenous inoculations. The comparison of the amounts of hyaluronidase present in lethal doses of the venom samples under investigation, as assayed by the method of Tolksdorf et al. (33) (Table VI), shows considerable variation in the hyaluronidase activity of the venom doses that provoke death on intravenous injection, whereas the quantities of this enzyme contained in the rather diverging subcutaneous lethal doses are remarkably similar. Therefore a closer examination of this matter is justified.

INFLUENCE OF HYALURONIDASE ACTIVITY OF VENOMS ON THEIR SUBCUTANEOUS TOXICITY

The possible rôle of hyaluronidase in the subcutaneous intoxication by venoms should become evident if its titer is artificially raised, or if the hyaluronidase of the venom is used up by its proper substrate prior to the injection of the venom. In these experiments, a commercial brand of bovine testicular hyaluronidase *, or hyaluronic acid, was added to the venom solutions, and the mixtures were incubated at 37°C for one hour before subcutaneous injection in female white nice. Control tests with the same venom solutions plus saline were run at the same time. Results are reported in Table VIII. The hyaluronidase increase in experiments No. 55, 56, 58 over the controls No. 34 or 35, respectively, was 25, 18 and 72% in the mean lethal doses. The amounts of hyaluronic acid added to the venom solutions in experiments No. 57, 59, 60 were sufficient to absorb 10,720, 580 and 850% of the hyaluronidase activity of the controls relative to the LD_{50}s. The results of these assays are rather confusing. Experiments No. 55, 56, 57 show that the reduction of hyaluronidase activity by large amounts of hyaluronic acid significantly decreases the toxicity of the venom

* Supplied under the trade-name "Hyalozima" by Opoterapica NESPA Ltda., São Paulo, S. P., through the courtesey of Dr. I. Martirani.

in comparison with that of the solutions to which hyaluronidase had been added. Just the opposite occurred in experiments No. 58, 59, 60, where hyaluronic acid enhanced the toxicity relative to the hyaluronidase enriched venom solution, in one case (experiment No. 58/60) even significantly from a statistical viewpoint. However, the extremely large error of the toxicity estimations in the control tests with venom alone makes it very probable that the conflicting results are merely due to chance. Thus, no evidence of the suggested influence of the venom hyaluronidase on the subcutaneous toxicity of venom is conceivable from the results of these experiments, which, however, are open to the criticism that, according to Haas (9) and Hechter (12), more factors than were controlled here are involved in the mechanism of spreading in vivo. Hence, the conclusion that hyaluronidase does definitely not enhance the toxicity of venoms would be premature.

DISCUSSION

In the vast literature on the spreading factor, or factors, of venoms, which is supposed to be hyaluronidase or a hyaluronidase-like substance, it has generally been accepted bona fide that a mechanism which promotes invasion of an organism is favorable for the action of a toxic or otherwise physiologically important substance. This view holds true for certain conditions such as the observations of Krech (13), who found that, in subcutaneous experiments, markedly less antitoxin is necessary to neutralize a previously injected dose of diphtheria toxin if hyaluronidase is added to the serum. In this case, the hyaluronidase will hasten the distribution of the antitoxin throughout the infected organism at a rate which without the aid of the enzyme might only be attained by higher doses of serum. The time element, however, is of no importance in snake poisoning under natural circumstances, because it is entirely irrelevant whether a serpent kills its prey in 5 or in 30 minutes. Moreover, in the case of venoms with pronounced local activity, there is still another aspect of the problem of spreading, namely that of the threshold concentration of venom required to overcome the natural resistance of the tissues to its action. It is obvious that the higher the hyaluronidase content of a given amount of venom, the faster the latter will spread and, thus, become diluted towards the critical level, below which no local damage occurs. This way, the final effect of venom hyaluronidase might be just the opposite of what is generally assumed.

A discussion of these disconcerting possibilities is rather useless before much more is known about the essential features of the physiologic mechanism by which venoms provoke death. In spite of the lack of evidence on the importance of the spreading factor in *Bothrops* poisoning supplied by the exper-

iments of this paper, a closer investigation of this matter also in other types of venom might yield interesting results, which possibly would be of help for a better understanding of these substances. For the benefit of snake bite therapy such research should also be extended to the interactions between antivenin and hyaluronidase. This will not be an easy task because by the proteic nature of sera their influence on hyaluronidase can hardly be determined turbidimetrically (33). On the other hand, the interpretation of viscosimetric assays (9) will be complicated by the concomitant reactions between distinct factors, which influence the viscosity of the system in different and independent ways: viscosity of hyaluronic acid, viscosity of antivenin, depolymerization of hyaluronic acid by venom, unspecific inhibition (9) and specific neutralization (4) of venom hyaluronidase by antivenin, proteolytic and thus viscosity reducing action of venom on serum, alteration of surface tension by venom (35), if the factor responsible for the latter phenomenon is different from the afore-mentioned ones.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author's thanks are due to Dr. M. de F. Amorim, Professor of Pathological Anatomy, Escola Paulista de Medicina, for diagnosis of the histological sections, and to Dr. I. Martirani, Public Health Service of the State of São Paulo, who assayed the hyaluronidase of the venom samples.

SUMMARY

This paper presents a collection of supplementary observations and experiments made in connection with an extensive study on *Bothrops* venoms and their antivenins published elsewhere (30).

A unilateral eye lesion provoked by subcutaneous injection of a certain sample of *Bothrops jararacussu* venom in mice is described.

The severity of the local reactions elicited by subcutaneous venom administration depends on the dose and not on the general toxicity of a venom. They are neutralized to a certain degree by species- and genus-specific antivenins. Local activity and total toxicity are neutralized at different rates. The significance of local damage in snake poisoning is amply discussed.

Survival times of mice after intravenous and subcutaneous inocculations of lethal venom doses with and without addition of antivenin are reported.

No congruence between in vivo titration and flocculation of antivenin was observed.

The order of toxicity of the venoms established by intravenous assay is generally reversed in subcutaneous determinations, which results in different

subcutaneous: intravenous indices for the various venom species of the same snake genus. As an explanation of this phenomenon, the possibility of a dual mechanism of death by venom is discussed.

Under the conditions of the experiment, no influence of hyaluronidase on the subcutaneous toxicity of venom was detected.

REFERENCES

1. Amorim, M. de F., & R. F. de Mello — Nefrose do nefrom intermediário no envenenamento crotálico humano. Estudo anátomo-patológico. (Mem. Inst. Butantan 24: 281; 1952).
2. Christensen, P. A. — Problems of antivenene standardization reveled by the flocculation reaction. (Bull. World Health Org. 9: 353; 1953).
3. Dekanski, J. — The effect of cutaneous burns on histamine in mice. (J. Physiol. 104: 151; 1945).
4. Duran-Reynals, F. — A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action. (J. Exp. Med. 69: 69; 1939).
5. Essex, H. E., & J. Markowitz — The psysiologic action of rattlesnake venom (crotalin). — 7. The similarity of crotalin shock and anaphylactic shock. (Amer. J. Physiol. 92: 698; 1930).
6. Feldberg, W., & C. H. Kellaway — Liberation of histamine from the perfused lung by snake venoms. (J. Physiol. 90: 257; 1937).
7. Feldberg, W., & C. H. Kellaway — Liberation of histamine and formation of lysocithinilike substances by cobra venom. (J. Physiol. 94: 187; 1938).
8. Githens, T. S., & L. W. Butz — Venoms of North American snakes and their relationship. (J. Immunol. 16: 71; 1929).
9. Haas, E. — On the mechanism of invasion. (J. Biol. Chem. 163: 63, 89, 101: 1946).
10. Hansen, A. — L'action de la pepsine et de l'acide chlorhydrique sur l'antitoxine diphthérique. (C. r. Soc. Biol. 129: 213; 1938).
11. Hansen, A. — Reinigung und Konzentrierung von Diphtherieantitoxin durch Adsorption nach der Autolyse mit Pepsin. (Biochem. Zschr. 299: 363: 1938).
12. Hechter, O. — Mechanism of spreading factor action. (Ann. New York Ac. Sci. 52: 1028; 1950).
13. Krech, U. — Der Einfluss von Hyaluronidase auf die therapeutische Wirkung des Diphtherieserums. (Zschr. Immunitätsf. & exp. Ther. 109: 427; 1952).
14. Martirani, I. — Personal communication. (1952).
15. Martirani, I., & M. P. Azevedo — Acção proteolítica do veneno da *Bothrops jararaca* (Wied). — II. Acção sôbre a gelatina. (Mem. Inst. Butantan 22: 47; 1950).
16. Moon, V. H. — Shock. (Philadelphia, 1942).
17. Moon, V. H., & P. J. Kennedy — The pathology of shock. (Arch. Path. 14: 360; 1932).
18. Petermann, M. L., & A. M. Pappenheimer, Jr. — The ultracentrifugal analysis of diphtheria proteins. (J. Physic. Chem. 45: 1; 1941).
19. Pope, C. G., & M. F. Stevens — The purification of antitoxin by absorption of non-antitoxic antibodies. (Brit. J. Exp. Path. 33: 56; 1953).
20. Pope, C. G., M. F. Stevens, E. A. Caspari & E. L. Fenton — Some new observations on diphtheria toxin and antitoxin. (Brit. J. Exp. Path. 32: 246; 1951).

21. Rocha e Silva, M., W. T. Beraldo & G. Rosenfeld — Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. (Amer. J. Physiol. 156: 261; 1949).
22. Schaumann, O. — Pharmakologische Versuche mit Schlangengiften und Schlangensera. (Behringwerk-Mitt. 7: 33; 1936).
23. Schöttler, W. H. A. — Die Gifte von Vipera latasti und V. lebetina. (Zschr. Hyg. & Infektionskr. 120: 408; 1938).
24. Schöttler, W. H. A. — Untersuchungen über Toxikologie und Serologie der europäischen Ophiotoxine. (Zschr. Hyg. & Infektionskr. 124: 141; 1942).
25. Schöttler, W. H. A. — Die Grenzen der Serumtherapie bei Bissen afrikanischer Giftschlangen. (Dtsch. tropenmed. Zschr. 47: 81; 1943).
26. Schöttler, W. H. A. — Bulgarische Viperngifte. (Zschr. Hyg. & Infektionskr. 126: 187; 1944).
27. Schöttler, W. H. A.: — Toxicity of the principal snake venoms of Brazil. (Amer. J. Trop. Med. 31: 489; 1951).
28. Schöttler, W. H. A. — Problems of antivenin standardization. (Bull. World Health Org. 5: 293; 1952).
29. Schöttler, W. H. A. — Antihistamine, ACTH, cortisone, hydrocortisone and anesthetics in snake bite. (Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 3: 1083; 1954).
30. Schöttler, W. H. A. — Serological analysis of venoms and antivenins. (Bull. World Health Org. 12: 877; 1955).
31. Schwiegk, H. — Shock und Kollaps. (Klin. Wschr. 21: 741, 765; 1942).
32. Schwiegk, H., & W. H. A. Schöttler — Kreislaufveränderungen nach Esmarchscher Blutleere. (Klin. Wschr. 22: 477; 1943).
33. Tolksdorf, S., M. H. McCready, D. R. McCullagh & E. Schwenk — The turbidimetric assay of hyaluronidase. (J. Lab. & Clin. Med. 34: 74; 1949).
34. Vellard, J., & F. Huidobro — Acción comparada de diversos venenos de ofidios sobre la presión arterial. (Rev. Soc. Argent. Biol. 17: 72; 1941).
35. Wada, H. — Pharmacological studies of snake (*Agkistrodon blomhoffi*) venom. (Japan Med. World 6: 308; 1926).
36. Werle, E., R. Kehl & K. Koebke — Über Bradykinin, Kallidin und Hypertensin. (Biochem. Zschr. 320: 373; 1950).
37. Witham, A. C., J. W. Remington & E. A. Lombard — Cardiovascular responses to rattlesnake venom. (Amer. J. Physiol. 173: 535; 1953).
38. Zeller, E. A. — Enzymes of snake venoms and their biological significance. (Adv. Enzymology 8: 459; 1948).

Fig. I — Necrosis of the eye-ball provoked by subcutaneus injection of a certain sample of *Bothrops jararacussu* Venom.

SEVERITY OF LOCAL REACTIONS (O — ++

LOG-DOSE OF VENOM	alternata L—8							atrox L—11							cotiara L—6				
	saline control	anti-alternata	anti-atrox	anti-cotiara	anti-jararaca	anti-jararacussu	anti-neuwiedii	saline control	anti-alternata	anti-atrox	anti-cotiara	anti-jararaca	anti-jararacussu	anti-neuwiedii	saline control	anti-alternata	anti-atrox	anti-cotiara	anti-jararaca
0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	··	—	—	—
0.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.4	0*	—	—	—	—	0*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.5	0*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.6	0*	—	—	—	—	0*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.7	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0*	—	—	—	—
0.8	+	—	0*	0*	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0*	0*	0*	—
0.9	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
1.0	++	—	0*	0*	0*	0	0*	++*	—	—	—	—	—	—	?	0*	0*	0*	0*
1.1	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—	0*
1.2	++	0*	+	0	0*	++	0*	++*	—	—	—	(+)*	—	—	?*	0*	0*	0*	0*
1.3	+++	—	—	—	—	—	—	+++*	—	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	0*
1.4	++++	++*	++	+	+	+++	++	+++	—	—	—	+*	—	—	?	+	0	0*	0
1.5	··	—	—	—	—	—	—	++++*	—	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	++
1.6	··	+++	··	++	++	++++	··	++++	—	—	+++	++*	—	—	?	++	··	+	+
1.7	··	—	—	—	—	—	—	++++	—	—	+++*	—	++*	—	··	—	—	—	+++
1.8	··	+++	··	+++	+++	··	+++	++++	+++	—	++++*	+++*	+++	—	?	··	··	++	··
1.9	—	—	—	—	—	—	—	++++	—	++++	++++*	—	+++	—	··	—	—	—	··
2.0	—	··	··	··	··	··	··	++++	+++	++++	++++*	+++	++++	+++	?	+++	··	+++	—
2.1	—	—	—	—	—	—	—	··	—	++++	++++	+++	++++	++++*	··	—	—	—	—
2.2	—	—	—	—	—	—	—	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	··	··	—	··	—
2.3	—	—	—	—	—	—	—	··	—	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—	—	—
2.4	—	—	—	—	—	—	—	··	··	··	++++	++++	++++	++++	··	··	—	—	—
2.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	··	—	—	··	··	—	—	—	—	—
2.6	—	—	—	—	—	—	—	—	··	··	—	—	—	··	—	··	—	—	—
2.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2.8	—	—	—	—	—	—	—	—	··	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Bars indicate the approximate position of the LD_{50}; * (**) indicates that no death (survival) occurred with this dose; lo

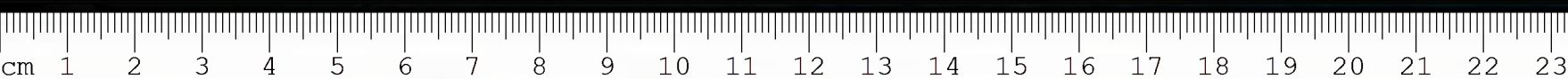



TABLE IV

PERCENTAGE OF MORTALITY AS A FUNCTION OF SURVIVAL TIME AFTER INJECTION OF LETHAL DOSES OF VENOM-ANTIVENIN MIXTURES

Type of antivenin	Days after injection on which death occurred							Number of observations
	1	2	3	4	5	6	8	
A. intravenous injection								
anti-alternata	91	7	2	0	0	0	0	120
anti-atrox	93	5	2	0	0	0	0	85
anti-cotiara.........	96	2	1	1	1	0	0	303
anti-jararaca........	97	3	0	0	0	0	0	274
anti-jararacussu	90	6	1	1	0	0	1	145
anti-neuwiedii	90	0	10	0	0	0	0	78
anti-Bothrops	92	6	1	1	1	0	0	131
Weighted average $\pm$ 1.96 σ	94$\pm$6	4$\pm$4	2$\pm$6	0$\pm$1	0$\pm$1	0$\pm$0	0$\pm$0	1136
B. subcutaneous injection								
anti-alternata........	80	14	3	3	0	1	0	147
anti-atrox	81	14	4	1	0	1	0	160
anti-cotiara.........	75	17	6	2	0	1	0	162
anti-jararaca	80	15	4	1	0	1	0	139
anti-jararacussu	73	18	7	1	0	1	0	325
anti-neuwiedii.......	76	17	5	1	0	1	0	150
Weighted average $\pm$ 1.96 σ	77$\pm$6	16$\pm$3	5$\pm$3	1$\pm$1	0$\pm$0	1$\pm$0	0$\pm$0	1083

Table V

COMPARISON BETWEEN PERCENTAGE OF INTRAVENOUS MORTALITY AND FLOCCULATION IN THE COMBINATION OF THE VENOMS WITH A FIXED DOSE OF ANTIBOTHROPIC SERUM B-114.

Log-dose of venom	Venom samples											
	alternata L-8		atrox L-11		cotiara L-6		jararaca L-5		jararacussu L-7		neuwiedii L-10	
	mortality	flocculate	mortality	flocculate	mortality	flocculate	mortality	flocculate	mortality	flocculate	mortality	flocculate
0.6									0	0		
0.7									0	0		
0.8	0	0	12	0	0	0			0	0		
0.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1.0	0	19	25	10	0	0	0	0	0	0	0	
1.1	20	31	12	10	0	0	0	trace	0	0	0	increasing turbidity ↓
1.2	22	91	29	0	20	27	0	trace	0	increasing turbidity ↓	0	
1.3	59	98	14	0	40	32	0	85	10		10	
1.4	80	51	0	23	100	35	40	100	30		10	
1.5	100	27	50	31	100	98	90	100	90		0	
1.6	100	18	62	33			100	96	100		70	
1.7	100	0	100	15			100	29	100		100	
1.8							100	20			100	

The figures for the flocculation test represent the height of the precipitate as percentage of the entire column of liquid.

TABLE VI

VARIOUS INDICES OF *BOTHROPS* VENOM ACTIVITIES

Venom sample	Order of toxicity (range)		Subcutaneous / intravenous Index (range)	mg of veoom containing ooe unit of hyaluronidase activity	Order of hyaluronidase activity in one LD_{50} (range)	
	intravenous	subcotaneous			intravenous	sobcutaneoos
alternata L-8..	5.3 (1.4-20.5)	1.4 (0.7-2.6)	8.1 (3.1-26.2)	0.073	26.8 (11.5-42.2)	2.1 (1.3-2.9)
atrox L-11	1.0 (0.4-1.6)	7.0 (2.3-13.3)	221.4 (84.0-755.2)	0.380	1.0 (0.4-1.5)	2.1 (1.3-2.9)
cotiara L-6....	5.7 (1.9-20.3)	2.1 (0.9-4.0)	11.5 (4.5-30.6)	0.058	35.9 (19.1-52.4)	4.0 (2.3-5.7)
jararaca L-5...	4.5 (1.5-15.9)	1.0 (0.7-1.3)	7.1 (3.5-16.8)	0.030	54.3 (29.0-79.7)	3.8 (2.8-4.8)
" L-14..	3.3 (0.4-14.4)	1.4 (0.8-2.4)	13.4 (5.5-83.9)	0.050	24.0 (4.8-43.2)	3.1 (2.3-3.9)
jararacussu L-7	1.1 (0.3-4.1)	6.0 (2.7-11.6)	171.4 (65.2-493.8)	0.390	1.0 (0.5-1.6)	1.7 (1.0-2.5)
" III	1.3 (0.2-5.5)	3.0 (1.1-6.3)	74.8 (18.8-596.9)	0.105	4.0 (0.9-7.9)	3.2 (1.5-5.0)
" IV	1.2 (0.2-6.2)	3.4 (1.2-7.2)	76.3 (19.0-609.9)	0.150	3.5 (0.7-6.2)	2.6 (1.2-4.0)
neuwiedii L-10	6.3 (1.1-26.5)	5.7 (2.7-10.8)	28.3 (9.9-111.2)	0.640	3.6 (1.0-6.2)	1.0 (0.6-1.4)

TABLE VII

MEAN SUBCUTANEOUS:INTRAVENOUS INDICES OF THE LD_{50}s OF VENOM-ANTIVENIN MIXTURES

Antivenins	Venom samples						
	alternata L-8	atrox L-11	cotiara L-6	jararaca L-5	jararaca L-14	jararacussu L-7	neuwiedii L-10
anti-alternata........	2.90	11.54	2.43	3.29	3.48	46.98	5.86
anti-atrox	3.46	7.26	2.70	2.61	2.31	10.36	5.05
anti-cotiara...	3.58	19.34	5.72	5.49	2.77	18.83	13.72
anti-jararaca	2.87	9.92	3.63	3.12	3.28	17.05	10.27
anti-jararacussu	3.00	8.14	4.74	1.62	2.55	6.28	9.89
anti-neuwiedii.......	2.81	8.30	2.90	2.39	3.19	10.51	5.28
Average (1.96 σ)	3.12 (0.57)	10.75 (8.00)	3.67 (2.31)	3.09 (2.35)	2.93 (0.82)	18.33 (26.44)	8.34 (6.87)

TABLE VIII

INFLUENCE OF HYALURONIDASE ON THE SUBCUTANEOUS TOXICITY OF VENOM SAMPLE BOTHROPS JARARACA L-5 FOR FEMALE WHITE MICE, AT LOG-DOSE INTERVALS OF 0.2 AND WITH 10 ANIMALS PER DOSE; PROBIT ANALYSIS.

Experiments			Animals				LD_{50}		χ^2 (degrees of freedom)		Heterogeneity factor	Regression coefficient		
			Weight in g		Number									
N°.	Date	Substance added to venom	average	range	total	Included in statistical analysis	mg/kg	Fiducial limits at p = 0.05	normal	pooled		b	Fiducial limits at p = 0.05	g criterion
34	3-12-51	saline	18.5	16-21	140	70	8.74	2.42-31.42	$13.2_{(5)}$	$9.6_{(4)}$	2.39	2.91	1.09-4.72	0.78
55	"	hyaluronidase 0.15 γ g.	18.7	17-21	140	80	10.10	7.80-13.48	$11.5_{(6)}$			3.35	2.08-4.63	0.14
56	"	" 0.30 γ/g.	18.5	16-21	140	60	9.16	7.40-11.53	$3.1_{(4)}$			4.92	2.87-6.97	0.75
57	"	hyaluronic acid 0.6 mg/g	18.5	17-20	140	70	16.95	13.11-21.74	$2.3_{(5)}$			3.79	2.35-5.24	0.15
35	11-1-52	saline	19.0	17-21	80	70	14.68	6.78-34.89	$11.4_{(5)}$	$9.4_{(3)}$	2.27	3.15	1.35-4.96	0.56
58	"	hyaluronidase 10:3	20.2	18-23	90	80	11.85	9.01-15.63	$5.0_{(6)}$			3.45	2.20-4.69	0.13
59	"	hyaluronic acid 1:2.5 ...	18.7	17-20	110	60	9.94	7.53-13.11	$4.6_{(4)}$			3.65	2.16-5.14	0.17
60	"	" " 1:5.0 ...	18.7	17-20	110	60	7.78	6.10-10.00	$3.7_{(4)}$			4.56	2.61-6.49	0.18

Mem. Inst. Butantan,
27:107-120. 1955/6.

ESCORPIÕES E ESCORPIONISMO NO BRASIL

IV. Considerações em torno de substâncias escorpionicidas e outras medidas de combate aos escorpiões.

WOLFGANG BÜCHERL

(*Laboratório de Zoologia Médica, Instituto Butantan*)

INTRODUÇÃO

Desde 1949 temos realizado experiências para verificar até que ponto se poderiam empregar *substâncias insecticidas* e outras medidas quaisquer no combate às duas espécies de escorpiões mais comuns e perigosas, em nosso meio, para o homem, o *Tityus serrulatus* e o *T. bahiensis*.

De 1949 para cá foram feitos ensaios isolados.

Octavio de Magalhães (1) experimentou o D. D. T. Etiénne Sergent (2) demonstrou as qualidades escorpicionicidas da mesma substância em realção a alguns escorpiões africanos. Lordello (3) usou o Rhodiatox e o B. H. C.. Lopes da Silva (4) obteve resultados promissores no tocante ao D. D. T. e principalmente o B. H. C., quando da campanha anti-escorpiônica de Ribeirão Preto. O Serviço de Profilaxia da Malaria veio confirmar estes resultados na recente luta profilática de Belo Horizonte.

Não era interessante, evidentemente, repetir simplesmente o que já tinha sido feito. Uma análise acurada, porém, dos resultados globais, obtidos com êstes insecticidas na luta contra os escorpiões, deixava entrever certas falhas, a exigir maior número de experiências, em ambiente de trabalho mais favorável, com testes de crítica mais precisos e, antes de tudo, com maior número de escorpiões por experiência, fazendo-se acompanhar a cada ensaio com o mesmo número de testemunhas, mantidos, o mais possível, nas mesmas condições de ambiente. No cômputo do cálculo final dos sucumbidos pela substância escorpionicida, podem, então, ser deduzidos os de *morte natural*.

Recebido, para publicação, em 23.I.1956.

Em quase nenhum dos ensaios, exetuado até certo ponto o de Sergent (2), considerou-se a natureza do escorpião. As duas espécies brasileiras, acima citadas, têm algo de sombrio e misterioso em seus hábitos de vida. Podem ficar imobilizadas perfeitamente semanas a fio, dia e noite, invisiveis e inexistentes para o homem e podem também, como que a um comando secreto, abandonar em massa seus esconderijos, invadindo em célere marcha noturna as habitações humanas.

Aprendemos, em nossa já longa lida com escorpiões vivos, que uma ausência não pode ser interpretada com inexistência dêstes aracnídeos.

Contudo, é hoje ponto pacífico que, em ensaios "*in vitro*" ou em caixas fechadas, onde não era possível fugir-se, sucumbem pràcticamente todos os escorpiões, quer se aplique o D. D. T. ou Gammexane ou ainda o Rhodiatox, seja após mistura do princípio ativo a um pó inerte ou por pincelagem ou pulvenização do insecticida pelos recipientes. O tempo de sobrevivência depende apenas das concentrações empregadas.

Nestas condições, o xilol, o clorofórmio, a naftalina, a gasolina vaporizada têm-se revelado excelentes escorpionicidas, embora quase ineficazes já em recipientes arejados e de ação pràcticamente nula em condições naturais (5).

Experiências em laboratório, mas adaptadas às condições do habitat natural dêstes aracnídeos, conduzidas com o D. D. T., e Gammexane e o Rhodiatox, nem sempre foram de molde a garantir um êxito 100%. Verificámos isto em ensaios próprios, oriundos de suspeitas, quando acompanhamos de perto a desinfecção de Ribeirão Preto e de Belo Horizonte. Os triunfos cantados em face das várias centenas e mesmo milhares de aracnídeos mortos ou capturados e trazidos aos "quarteis-generais" da campanha pela população prestimosa e desafogada, pareciam-nos algo prematuros, embora a mortalidade escorpiônica tivesse sido realmente impressionante, tendo decaido igualmente a cifra dos acidentados. Mesmo então não nos parecia o "escorpionismo um problema resolvido". Realmente, receberam as nossas suspeitas confirmação alguns anos depois de Ribeirão Preto, onde o Pronto Socorro Municipal, sob a eficiente direção do Dr. Chiarello, teve o desprazer de registrar os seguintes algarismos de acidentes humanos por *T. serrulatus*:

Em 1945 .... 48 acidentes,
em 1946 .... 65 acidentes,
em 1947 .... 83 acidentes,
em 1948 .... 196 acidentes,
em 1949 .... 330 acidentes,
em 1950 (1.º semestre) .... 263 acidentes,

Em 14 de Junho até fins de Julho de 1950 verificou-se a campanha intensiva, escorpionicida, desinfectando-se 798.590m² de muros, cercas, prédios, ruas, quintais, galerias pluviais, etc. e gastando-se 2.129 Kg de B. H. C. a 10% e 200Kg. de D. D. T. a 30% (4). Entretanto, apesar de tudo isto, mantinham-se os acidentes humanos, socorridos pelo Pronto Socorro, em 1951 e 1952 em torno de 200.

Um facto paralelo parece verificar-se em Belo Horizonte, onde apesar das campanhas escorpionicidas e apesar da diminuição dos acidentes humanos, foram coletados e enviados ao Instituto Butantan, durante o ano de 1955, nada menos do que 40.000 "telsa" de *T. serrulatus*.

MATERIAL E MÉTODO

Em cada ensaio vimos empregando 8 *Tityus serrulatus* e 8 *Tityus bahiensis* adultos, acompanhdos do mesmo número de testemunhas para a verificação da mortalidade natural. Os testemunhas foram mantidos em condições de ambiente iguais aos escorpiões sob ensaio, exeto o contacto com a substância a ser ensaiada.

Como "escorpionicidas" empregámos o Dicloro-difenil-tricloro-etano ou D. D. T., o tiofosfato de dietil paranitrofenila ou Rhodiatox e o hexacloreto de benzeno ou B. H. C. (Gammexane), em suspensões aquosas ou em pó, pesando-se, antes de cada ensaio, tanto a substância activa como o veículo, ou medindo-se o volume de água de suspensão. Julgamos esta precaução de grande importância. De um lado, porque outros nem sempre se tinham dado conta da quantidade de insecticida realmente empregada, ainda que tivessem declarado a porcentagem das suspensões ou dos pós. Por outro lado, poderiam surgir normas sôbre as diluições eficientes dos insecticidas, evitando gastos inúteis com concentrações maiores.

A ordem dos ensaios foi estabelecida da seguinte maneira:

A. *Por contacto direto do insecticida com o escorpião:*

a) *contacto permanente:*

No chão do recipiente era espalhado determinado volume de substância a ensaiar, permanecendo os escorpiões no mesmo recipiente, enquanto viviam ou até que tornassem a alimentar-se, não mais se ressentindo da toxicidade. Temos omitido propositadamente a pincelagem do material sôbre o corpo do escorpião ou a submersão do aracnídeo na suspensão, por ser já garantido o contacto direto

(com as pernas e o ventre) e ainda porque julgamos êstes dois processos artificiais em demasia.

b) *contacto temporário*:

Os escorpiões permaneciam no recinto, cujo chão estava impregnado com o insecticida apenas durante *10 minutos, 30 minutos, 1 hora* e *5 horas*: Removia-se depois qualquer vestígio da substância tóxica por lavagem e submersões dos escorpiões em água. Os lotes de testemunhas também eram submetidos aos banhos em água.

c) *contacto tardio*:

Sem nova edição de insecticida eram as caixas expostas ao sol, à chuva e aos ventos, permanecendo, em média 8 a 15 dias ao relento. Depois colocaram-se nelas os 16 escorpiões com permanência durante 24 horas, sendo em seguida removidos para ambiente normal. Afigurava-se-nos que, se por ventura ainda fosse verificada qualquer "acção residual", deveriam os escorpiões ressentir-se dela já dentro de 24 horas, procurando, então, a salvação na fuga.

B. *Em ambiente, o mais possível, natural*:

Com alguns tijolos, cacos de telha, pedaços de rebôco endurecido, algumas cascas de árvore, um pouco de terra arenosa, um tufo de grama fazia-se um "esconderijo" natural de 40 cm de diâmetro, mais ou menos, dentro de uma caixa de 2 metros de comprimento por 90 cm de largura e 30 cm de altura, com paredes de vidro e tampas superiores de telas de arejamento. A certa distância eram instalados mais dois outros esconderijos semelhantes.

B_1: Pulverização (pela superfície externa, frestas e fendas de um dos esconderijos, sob o qual tínhamos alojado os escorpiões momentos antes) de um volume medido de insecticida.

Permitia-se aos escorpiões, acossados, que abandonassem a zona perigosa, instalando-se sob os outros "montículos", livres de tóxicos.

B_2: Com um regador espalhava-se abundante água sôbre o esconderijo envenenado, a imitar, p. ex., uma pequena área de horta, tratada com insecticida, mas submetida a chuvas. 8 dias depois colocavam-se os 16 escorpiões, que também neste ensaio podiam refugiar-se sob os outros 2 esconderijos naturais, caso se sentissem intoxicados no primeiro.

Tanto os animais "sub experientia" como os testemunhas tinham sempre água potável à disposição. Terminada uma experiência com uma substância ou uma diluição, lavavam-se os viveiros com abundante água, em operações repetidas. Depois colocavam-se alguns escorpiões neles com alimento e água, etc., para se ter a certeza da inocuidade dos recipientes. Sòmente em seguida empregavam-se os mesmos para nova experiência.

As *manipulações* das substâncias tóxicas faziam-se longe do recinto das experimentações, para evitar que possíveis emanações viessem a alterar os resultados.

O tempo de observação dos "candidatos" extendia-se até a morte ou até que os sobreviventes encetassem novamente vida normal, com aceitação de alimento, etc..

RESULTADOS

I. Com o Rhodiatox: — (em suspensão aquosa)

Tempo de contacto	Gramas de substância por m²	Animais de experiência		Testemunhas
		intoxicados	mortos	mortos
permanente	0,13	5 b. e 3 s.	4 b. e 2 s.	3 b. e 1 s.
permanente	0,25	6 b. e 4 s.	6 b. e 3 s.	1 b.
10 minutos	0,25	2 b. e 3 s.	1 b.	1 s.
30 minutos	0,25	3 b. e 2 s.	2 b. e 1 s.	2 b.
1 hora	0,25	5 b. e 4 s.	5 b. s 4 s.	2 b. e 1 s.
5 horas	0,25	7 b. e 6 s.	6 b. e 5 s.	— —
cont. tardio	0,13	2 b. e 2 s.	1 b. e 1 s.	2 b. e 1 s.
B 1	0,25	4 b. e 3 s.	4 b. e 3 s.	1 b.
B 2	0,25	2 b. e 2 s.	2 b. e 2 s.	2 b. e 1 s.

b. = *Tityus bahiensis.* s = *Tityus serrulatus*

O contacto direto de 10 minutos, o contacto tardio e o ensaio B2 revelam a pouca possibilidade do Rhodiatox, fora de casa.

II. Com o D. D. T. em suspensão aquosa:

Tempo de contacto	Gramas de substância por m^2	Animais de experiência		Testemunhas
		intoxicados	mortos	mortos
permanente	0,5	4 b. e 5 s.	3 b. e 3 s.	— —
permanente	1,0	5 b. e 4 s.	5 b. e 3 s.	2 b. e 1 s.
permanente	2,0	8 b. e 8 s.	8 h. e 7 s.	— —
10 minutos	2,0	0 b. e 2 s.	0 b. e 0 s.	1 b.
30 minutos	2,0	6 b. e 5 s.	3 b. e 2 s.	— —
1 hora	2,0	7 b. e 6 s.	5 b. e 5 s.	1 b.
5 horas	2,0	8 b. e 8 s.	7 b. e 6 s.	1 b. e 1 s.
cont. tardio	2,0	2 b. e 1 o.	1 b. e 1 s.	2 b. e 2 s.
B 1	2,0	. e 4 s.	5 b. e 4 s.	1 b. e 1 s.
B 2	2,0	1 b. e 2 s.	2 b. e 2 s.	1 b. e 2 s.

O D. D. T. é superior ao Rhodiatox, quando em concentração perto de 2 g de substância ativa por metro quadrado. Precisa, entretanto, estar em contacto direto pelo menos por 30 minutos com o corpo do escorpião. Pelo sol e as chuvas seu poder escorpionicida se extingue ràpidamente.

III. Com o D. D. T. em pó, com 5% do princípio ativo:

Em nossa lida com os escorpiões temos verificado que êles costumam ajuntar-se invariàvelmente sob qualquer esconderijo, que os abrigue da luz. A fotofobia é mesmo tão pronunciada que êles se escondem sob cartões quadrados, de bordos dobrados para baixo, apesar de estar presente sob êstes esconderijos uma substância tóxica.

Apenas 10 gramas do pó de D. D. T. com 5% de substância ativa foram espalhados sob 2 cartões (5 gramas sob cada um). Não sentem os escorpiões nenhuma repulsa ao insecticida, chegando a refugiar-se da luz sob os cartões e a deitar-se directamente sôbre o tóxico, resultando disto um contacto directo permanente, de maneira que pudemos dispensar ensaios do contacto temporário.

Resultados: — Dentro de 3 dias sucumbiram todos os 16 escorpiões. Os sinais de intoxicação (tremores das pernas e da cauda, movimento convulsivo das pernas, dos pentes, abaixamento total da cauda, dedos das mãos abertos, marcha titubeante, com a cauda extendida e quedas por desequilíbrio, finalmente extensão completa sôbre o dorso ou o ventre) se estabeleciam após mais ou menos 3 horas de contacto. A agonia era longa, perdurando até dois dias.

Sem renovar o insecticida sob os cartões repetia-se a experiência, após 2 semanas e 1 mês, sucumbindo novamente todos os 16 escorpiões. Após a expo-

sição do viveiro ao sol e à chuva e renovação dos cartões, não se via mais vestígio do pó e dos 16 escorpiões sucumbiram apenas 3 b. e 2 s., dentro de 8 a 27 dias, morrendo neste tempo 3 b. e 2 s. dos testemunhas.

IV. Com o B. H. C. em pó, com 1% de isômero gamma:

As condições das experiências foram idênticas às do D. D. T. em pó; os resultados davam sempre, durante 2 mêses (4 ensaios), uma mortalidade de 100%. Após meia hora os escorpiões abandonavam, já intoxicados, os esconderijos, mas tornavam a voltar a êles. Morriam de costas, com abdomen flácido e as pernas em flexão. Todos tinham insecticida aderido ao ventre.

O sol e a chuva neutralizavam também os efeitos dêste insecticida.

V. Com o B. C. H., em suspensão aquosa de 0,1 g, 0,5 g e 1,0 g de isomêro gamma por metro de superfície:

Tempo de contacto	Gramas de substância por m^2	Animais de experiência		Testemunhas
		intoxicados	mortos	mortos
permanente	0,1	6 b. e 6 s.	5 b. s 4 s.	2 b. c 2 s.
permanente	0,5	8 b. e 8 s.	8 b. e 8 s.	— —
permanente	1,0	8 b. e 8 s.	8 b. e 8 s.	— —
10 minutos	0,50	8 b. e 8 s.	6 b. e 5 s.	1 b. —
30 minutos	0,50	8 b. c 8 s.	7 b. e 7 s.	— —
1 hora	0,50	8 b. e 8 s.	8 b. e 8 s.	— —
cont. tardio	0,50	4 b. e 2 s.	4 b. e 2 s.	2 b. e 2 s.
B 1	0,50	8 b. e 8 s.	7 b. e 5 s.	1 b. e 2 s.
B 2	0,50	4 b. e 3 s.	5 b. e 4 s.	2 b. e 1 s.

Também o B. H. C., sem dúvida o escorpionicida mais enérgico entre os ensaiados, tanto em pó como em suspensão aquosa, não mata 100% quando em ambiente natural. Também êle é enfraquecido e mesmo neutralizado sob a ação das chuvas. Intoxica, entretanto, muito mais ràpidamente do que o D. D. T.; o fato, entretanto, de agir também como repelente, pois faz que os escorpiões empreendam a fuga, parece-nos uma desvantagem.

DEDUÇÕES DOS RESULTADOS

As experiências demonstram claramente:

a) que deve haver *contacto directo* entre o insecticida e o corpo do escorpião;
b) que êste contacto deve ser pelo menos de *1 hora* com B. H. C., de mais de *5 horas* com o D. D. T. e o Rhodiatox;

c) que nas suspensões aquosas se obtém resultado bom sòmente com *meio grama* de B. H. C., com 2 gramas de D. D. T. e com *mais de meio grama* de Rhodiatox por metro quadrado;

d) que os três insecticidas *perdem ràpidamente sua atividade,* quando espalhados em áreas, sujeitas a chuvas, ventos e sol;

e) que, *sob a forma de pó,* o D. D. T. com 0,25 g. de dicloro-difenil-tricloroetano em cada 5 g. de pó inerte e o B. H. C. com 0,05 g. de isômero gamma por 5 g. de pó inerte constituem os *escorpionicidas por excelência,* com uma ação residual suficiente por várias semanas, quando ao abrigo das chuvas e da luz.

As campanhas realizadas em Ribeirão Preto e em Belo Horizonte não puderam acabar com os escorpiões, porque uma grande percentagem dêstes aracnídeos não foi atingida diretamente e ainda porque a ação dos insecticidas fora neutralizada em breve tempo pela ação das chuvas, do sol e dos ventos.

Nestas circunstâncias não seria lógico pensar-se em dar combate aos escorpiões no próprio campo. Após cada queda de chuva deveria repassar-se o insecticida. Há a considerar ainda que o escorpião, principalmente o *T. bahiensis,* costuma viver até 2 metros dentro da terra, sob cupins, em buracos profundos, cavados por outros animais, em fendas e rachaduras do solo, onde jamais é atingido diretamente por nenhum dêstes insecticidas. O mesmo ocorre naturalmente nos quintais, nas hortas e nos jardins das habitações humanas.

Daí êles são transportados pelo homem para junto de sua habitação ou diretamente para dentro dela com a lenha, os tijolos, as madeiras, as forragens, etc.. Muitas vêzes êles chegam à habitação humana, porque o próprio homem constroi sua casa diretamente por cima do "habitat" escorpiônico, como verificamos repetidas vêzes no Pacaembú, Pacaembùzinho, nas encostas do Sumaré, Jardim Paulista e Cidade Jardim, todos bairros da Capital de S. Paulo.

Da necessidade do contacto direto do tóxico e de sua neutralização pelas chuvas, dos hábitos de vida dêste aracnídeo omnipresente e ausente ao mesmo tempo, deduz-se que o *combate eficiente ao escorpionismo* é complexo.

O escorpião é muito ardiloso. Pode esperar escondido dias, semanas e mêses; pode simular uma perfeita ausência, principalmente no inverno e nos mêses precedentes e seguintes ao inverno. De repente, no verão, ele aparece dentro dos globos de lúz, pendentes do tecto, no banheiro, completamente azulejado e ladrilhado, em torno do tanque e do W.C. do quintal.

A nossa luta contra ele deve ser também ardilosa e paciente, prolongada por mêses e anos. Deve ser feita *dentro da casa* e nos quintais em lugares abrigados da chuva.

A melhor maneira, adaptada às tendências do escorpião e de resultados realmente seguros, tanto em residências ricas como em habitações modestas, consiste em adquirir um meio kilo de D. D. T. ou Gammexane em pó. Adquirem-se ainda algumas folhas de *papelão preto*, do qual se cortam quadrados de 10 x 15 cm. de lado. Dobram-se então três bordos para baixo, na largura de 1 cm. apenas, deixando-se um lado aberto como "entrada". Ao longo da parede interna da casa, directamente encostado nela, colocam-se um ou dois dêstes "esconderijos", espalhando-se por baixo dêle, directamente no chão, o pó insecticida, em camada muito fina.

Após limpeza geral, renova-se a camada de pó, fazendo-se o mesmo em cada 2.º mês. Basta uma das armadilhas em cada cômodo, no banheiro, no porão, alpendre, etc.; e após dias, semanas ou mêses, veremos aparecer escorpiões mortos ou agonizantes.

Os ensaios com o pó do D. D. T. e do B. H. C. não deixam dúvida a respeito. Como não há luz direta nem chuva, os insecticidas conservam sua ação durante semanas. O escorpião, por seu turno, tem tanta atração pelo escuro em suas marchas ao longo das paredes, que se refugia imediata e irresistìvelmente nestes esconderijos. Tendo apenas 1 cm. de altura, obrigam-no a deitar-se, de maneira que seu ventre e a própria cauda entram em contacto imediato com a substância tóxica.

Nos citados bairros da Capital de São Paulo houve franco entusiasmo por êste método barato, pouco trabalhoso e sumamente eficiente.

OUTROS MEIOS DE COMBATE AOS ESCORPIÕES

Há uma infinidade de recursos e de métodos que podem convergir no combate aos escorpiões.

Entre os animais ocasionalmente *escorpionívoros* sobressaem a *galinha doméstica* e o *sapo* (*Bufo marinus marinus* e *B. m. paracnemis*).

A *galinha,* embora durma quando o escorpião é activo, costuma nas hortas e nos quintais da população suburbana devorar um considerável número de escorpiões, escondidos de dia sob folhas, cascas e pequenos pedaços de detrito.

O sapo enfrenta o escorpião, persegue-o mesmo de noite e o devora sem maiores dificuldades. Temos observado repetidas vêzes que o sapo, antes de dar o golpe certeiro, examina o escorpião como que a verificar o melhor "jeito" para engulir o aracnideo.

Uma das melhores possibilidades de combater os escorpiões reside, a nosso ver, na *construção das casas* pouco propícias a êste. Julgamos êste ponto de grande importância. Acreditamos mesmo ser necessário, em zonas onde há êste problema, que nas escolas de engenharia se administrem algumas instruções aos engenheirandos, para que construam casas sòmente com muros lisos e comple-

tamente rebocados; não permitam adornos de madeira, muros lisos de simples tijolos, sem rebôco, revestimentos com granito, sem enchimento seguro dos vãos com argamassa de cal, areia e cimento.

A *instrução* do povo e das crianças escolares sôbre o modo de proceder em face do escorpionismo é sumamente importante. Se nos quintais das moradias da população menos favorecida de Belo Horizonte, de Ouro Preto, Mariana, Aparecida etc., não houvesse o mais variado depósito de "cacarecos" velhos (alguns tijolos empilhados, táboas sobrepostas, chapas de folhas empilhadas em porões abertos, canteiros delimitados por fileiras de pedras ou tijolos soltos, etc.), fácil seria mantê-los limpos e menos numerosos seriam os esconderijos naturais dos escorpiões.

A *captura dos escorpiões* merece lugar de destaque entre as medidas profiláticas mais eficientes.

Relatam E. Dias e colaboradores (5) que o Instituto Oswaldo Cruz de Belo Horizonte tem adquirido, em 6 anos, nada menos de 107.533 escorpiões vivos ou mortos sòmente da cidade de Belo Horizonte.

O Instituto Butantan, no período de 1950 a 1955, recebeu por compra directa ou permuta contra sôros 107.542 escorpiões ou sejam 63.218 "telsa" de *Tityus serralatus,* 30.727 "telsa" de *T. bahiensis* e 3.902 *T. serrulatus* e 9.695 *T. bahiensis* vivos.

Pela captura de uma fêmea adulta pode evitar-se a existência de mais 15 ou 25 filhotes no ano seguinte.

CONCLUSÃO

Nas regiões brasileiras, onde existe o problema do *escorpionismo,* pode ser controlado e reduzido a proporções toleráveis, não tanto por campanhas esporádicas de exterminação, mas principalmente pela ação persistente e ininterrupta, de cada habitante e do povo em geral.

De acôrdo com os hábitos dos escorpiões de refugiar-se da luz diurna sob qualquer lugar baixo que garanta escuridão, constitúi medida econômica e fácil espalhar-se 1 g. de D. D. T. ou Gammexane em pó diretamente no chão, ao longo das paredes internas, numa área de 10 a 15 cm. quadrados colocando-se por cima pequenos papelões quadrados, com 1cm. de altura apenas, para que os escorpiões se possam refugiar sob os mesmos, chegando em contacto direto com o insecticida.

Recursos outros, como a captura direta, a construção da *moradias humanas* pouco habitáveis para os escorpiões, com uma faixa sòlidamente cimentada em torno, com muros, paredes e fôrros sem fendas ou rachaduras, meticulosamente rebocados e alisados, sem obras de arte de madeira, sem plantas rasteiras ou trepadeiras pelos muros, a *proteção* do sapo e da galinha (quando outras circunstâncias concorram para que êstes dois animais possam ser tolerados ao

redor do homem), constituem outros tantos fatores a ajudar o homem na luta contra os escorpiões.

RESUMO

Estudos experimentais sôbre o Rhodiatox, o D. D. T. e o Gammexane são apresentados para verificação de seu poder escorpionicida sôbre as duas espécies brasileiras, o *Tityus serrulatus* e o *T. bahiensis.*

O Rhodiatox em suspensão aquosa, na concentração de 0,25 g. por metro^2 de superfície não chega a matar mais do que 70% dos escorpiões, mesmo quando em contacto direto de pelo menos 5 horas.

O D. D. T. em suspensão aquosa, com 2 g. de substância ativa por metro quadrado, mata entre 90 a 95%, quando em contacto direto de pelo menos 5 horas.

O Gammexane, em suspensão aquosa, na concentração de 0,5 g. por metro^2 de superfície, mata pràticamente 100% dos escorpiões, quando em contacto direto de pelo menos 1 hora.

Não se verificando, entretanto, contacto direto, nenhum dos 3 insecticidas, nas concentrações referidas, pode ser considerado satisfatório. A mesma deficiência ocorre quando êstas substâncias sofrem os efeitos da chuva, do sol e de outras condições atmosféricas, inclusive a secagem dentro das casas, parecendo-nos que as suspensões aquosas além de serem de custo elevado, quando espalhadas a esmo e por áreas extensas, não venham a constituir método ideal para combater êstes aracnídeos.

O D. D. T. *em pó,* entretanto, com 5% de principio ativo, ou o B. H. C. *em pó,* com apenas 1% de isômero *gama* por metro quadrado, espalhados um ou outro no chão, sob pequenos cartões, na quantidade de *1 g. apenas* para cada cartão, colocados ao longo das paredes internas ou externamente ao abrigo das chuvas, devem ser considerados escorpionicidas *com 100%* de atividade.

Também aqui o escorpião deve chegar em contacto direto com a substância tóxica. A permanência dêstes esconderijos nos cômodos nas habitações humanas durante mêses e talvez anos e a renovação do insecticida cada segundo mês, garante, quase com certeza, que algum dia o escorpião, em suas peregrinações noturnas pela casa, se refugie da luz matinal sob um dos cartões, estabelecendo o contacto mortifero.

Esta maneira de agir constitúi um método prático e pouco trabalhoso; implica diminutos gastos e reduz, com o tempo, ao mínimo o problema do escorpionismo.

SUMMARY

Experimental studies on the effect of insecticides on the 2 most common scorpions, in S. Brazil, *Tityus serrulatus* and *T. bahiensis,* are presented in this

paper. The following insecticides were investigated: Diethyl-paranitrophenyl-thiophosphate (Rhodiatox), dichlorodiphenyl-trichloroethane (D. D. T.) and benzene hexachloride (Gammexane).

Rhodiatox, suspended in water and sprayed in a concentration of 0.25 g per square meter, kills about 70% of scorpions, after direct contact for more than 5 hours.

D. D. T., suspended in water and aprayed in a concentration of 2 g. of active substance per square meter, kills about 90 — 95% of scorpions, after direct contact of 5 hours.

Gammexane, suspended in water, in a concentraion of 0,5 g. per square meter, kills practically all scorpions, after a direct contact for 1 hour.

If no direct contact exists between the chemical and the arthropod or if the three insecticides are exposed to rain, wind, sun or other climatic conditions, these concentrations are no more effective.

D. D. T. powder with 5% of the active principle, and gammexane with 1% of the *gamma* isomer for square meter seem to be the *best substances* for killing nearly all scorpions. The following technique for using the insecticides has been found very effective in our experiments: Little boxes (10 to 15 cm. on each side and 1 cm high, one face open) are constructed with black paper and placed arround the internal walls of each room of the house. The insecticide is sprayed on the ground, one gram under each box, and renewed every 4 months. The scorpions, walking from room to room during night, always use the boxes to protect themselves from the daylight and thus came into direct contact with the insecticides spray.

Our experiments show that 100% of these are killed in this simple and practical way.

Under these conditions it is advisable that, in such localities afflicted by scorpionism as Belo Horizonte, Ouro Preto, Mariana and Passagem, all in the State of Minas Gerais, Ribeirão Preto, Pontal and Aparecida do Norte in the State of S. Paulo, the problem can be greatly reduced if those boxes are permanently placed in all houses, rooms and gardens and protected from direct rain and daylight.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit werden Versuche mit einigen der modernen Schädlingsbekämpfungsmittel gegen die beiden giftigsten brasilianische Skorpione, den *Tityus serrulatus* und den *T. bahiensis*, dargelegt.

Das Diaethyl-Paranitrophaenyl-Thiophosphat oder Rhodiatox, das Dichlor-Diphaenyl-Trichloraethan oder D. D. T. und das Benzen-Haxachlorid oder Gammexan wurden versucht.

Das in Wasser emulsionierte Rhodiatox, tötet, bei einer Konzentration von 0,25 g. pro Quadratmeter, nur bis 70% de Skorpione, wenn es mindestens 5 Stunden lang in direktem Kontakt mit diesen gelangt ist.

Das in Wasser aufgelöste D. D. T. und mit einer Konzentration von 2 g. des wirksamen Prinzipes pro Quadratmeter, kann schon 90 bis 95% der Skorpione töten, wenn es ebenfalls wenigstens 5 Stunden lang in direktem Kontakt mit diesen gekommen ist.

Das in Wassr suspendierte Gammexan tötet schon in einer Konzentration vom 0,5 g. des Gamma Isomers pro Quadratmeter an die 100% aller Skorpione, wenn es wenigstens 1 Stunde lang in direktem Kontakt mit diesen war.

Kommt es jedoch zu *keinem direktem Kontakt* oder trocknen diese drei in Wasser emulsionierten Substanzen aus oder werden durch Regen, Sonne, Wind und andere klimatische Verhältnisse beeinflusst, kann keine der Dreien mehr als *befriedigend* angesehen werden.

An Hand der Tatsache, dass diesse Bekämpfungsmittel direkt mit dem Körper der Skorpione in Berührung kommen müssen und dass sie andererseits, hauptsächlich durch Regen und Sonne baldigst unschädlich gemacht werden, hat. Verfasser geine Methode ausgearbeitet, die diesen beiden Postulaten weitest gerecht wird und die, wie experimentell durch Versuchsreihen gezeigt werden konnte, auch tatsächlich die Skorpionplage auf ein zulässiges Minimus herabdrücken kann.

Aus schwarzem Pappkarton werden 10 bis 15 cm. lange und breite Vierecke herausgeschnitten. An drei Seiten wird 1 cm breiter Rand nach unten gebogen, während die vierte Seite offen gelassen wird. Man streut dann etwa ein Gramm D. D. T., mit 5% der aktiven Substanz oder 1 Gramm Gammexan mit 1% Gamma Isomer, in Pulverform direkt aul den Boden, und zwar den inneren Hauswänden entlang und setzt über dieses Pulver die angefertigten Verstecke.

In sehr verseuchten städtischen Bezirken, wie in Belo Horizonte, Ouro Preto, Mariana, Passagem, etc., im Staate von Minas Gerais oder in Ribeirão Preto, Pontal, Aparecida do Norte, etc., im Staate von São Paulo, empfiehlt es sich, möglichst viele solcher Unterschlüpfe in jedem Raume des Inneren der Wohnhäuser und auch im Garten (geschützt vor Regen und Sonne) anzubringen.

Alle zwei Monate ist die wirksame Substanz zu erneuern und die Verstecke sollen monate oder jahrelang aufgestellt werden.

Es ist eine allen Fachleuten bekannte Tatsache, dass die Skorpione nur des Nachts die Hauser und Gäarten durchstreifen, sei es auf der Suche nach Beute oder, um einen anderen, mehr zusagenden Wohnsitz zu finden. Vom Tageslicht überrascht, suchen sir sich immer ein dunkles Versteck. Dabei laufen sie regelmäassig den Wänden entlang. Da aufgestellte Unterschlüpfe werden auch sofort benützt und der Skorpion pflegt selbst dann darin zu bleiben, wenn auch

D. D. T. order Gammexan in Pulverform darin ausgestreut wurd. Durch die geringe Höhe der Kartons, pflegen sich die Tiere hinzulegen und kommen so mit diesen Substanzen in unmittelbaren Kontakt und werden auch tatsächlich 100%-ig getötet.

Die äusserst einfache Methode kann von jedermann ausgeführt werden und dürfte die billigste und wirksamste Form darstellen, um der Skorpionplage in den genannten Städten allmählich Herr zu werden.

BIBLIOGRAFIA

1. Magalhães, O. de — Combate ao escorpionismo. Mem. Inst. O. Cruz 44(3): 425-439, 1946.
2. Sérgent, E. — De l'utilisation du D. D. T. contre les Scorpions. Arch. Inst. Pasteur d'Algèrie 26(4): 397-401; 1948.
3. Lordello, L. G. E. — Notícia premilinar sôbre a ação do B. H. C. e do Rhodiatox nos escorpiões *T. bahiensis* e *T. serrulatus*. Rev. Agricult. Piracicaba 25(11-12): 367-380, 1950.
4. Silva Lopes, T. — Escorpionismo em Ribeirão Preto. Arq. Hig. Saúde Pública, S. Paulo, 15:79-90, 1950.
5. Dias, E., Libano, S. e Lisboa, M. — Lucta contra os escorpiões. Mem. Inst. O. Cruz 17:17-44, 1924.
6. Bücherl, W. — Manutenção de escorpiões em viveiros e extração de veneno. Me. Inst. Butantan 25(1): 53-82, 1953.
   — Atividade das peçonhas de *Tityus serrulatus* e *T. bahiensis* sôbre camundongos. Mem. Inst. Butantan 25(1): 83-108, 1953.
   — Studien über einige brasilianische Skorpione und ihre Trocken gifte. Arzneim. — Forsch. 5:68-72, 1955.

Mem. Inst. Butantan,
27:121-155. 1955/6.

ESCORPIÕES E ESCORPIONISMO NO BRASIL

V. Observações sôbre o aparelho reprodutor masculino e o acasalamento de *Tityus trivittatus* e *Tityus bahiensis*.

WOLFGANG BÜCHERL

(*Laboratório de Zoologia Médica, Instituto Butantan*)

INTRODUÇÃO

Foram relativamente poucos os pesquisadores a preocupar-se com o estudo da morfologia e anatomia do aparelho genital dos escorpiões em geral e do comportamento dos mesmos no acasalamento.

Não houve maior dificuldade na descrição morfológica dos testículos, como dois tubos esbranquiçados, com ramificações transversais e uma longitudinal, anastomosadas. Surgiram, entretanto, pontos de vista divergentes no tocante aos condutos eferentes dos testículos.

Pawlowsky (1), Werner (2) e Vachon (3) designaram estas partes com o nome costumeiro de "vasos deferentes". Piza (4), entretanto, tem constatado que, pelo menos o trecho próximo aos testículos podia exercer função gametogênica (7) e que esta atividade só cessaria temporàriamente, quando o excesso de produção de espermatozoides obrigaria êste trecho a servir de depósito aos mesmos, funcionando então como "vesícula seminal suplementar" (5;6).

As opiniões foram ainda mais desencontradas no tocante aos dois órgãos genitais, localizados na parte anterior do pre-abdomen, um de cada lado. Dufour (8) e Blanchard (9) designaram os dois orgãos com os nomes de "canais do penis" (furreaux des verges), atribuindo-lhes função precípua no acasalamento.

Pawlowsky (1), entretanto, num exaustivo estudo comparativo sôbre o aparelho genital dos machos de *Scorpio maurus, Bathus eupeus, Heterometrus cyaneus, Isometrus maculatus, Lychas mucronatus, Tityus cambridgei, Centrurus margaritatus, Uroplectes triangulifer, Urodacus manicatus, Calchas nordmanni*.

Recebido, para publicação, em 27.III.1956.

Hemiscorpio lepturus, Opisthacanthus clatus, Broteas gramimanus, Vejovis spinigerus, Bothriurus vittatus e de muitas outras espécies, afirmou positivamente que os dois orgãos nada tinham que ver com o acasalamento. As "lâminas" estreitas, longas e de côr marron, que transparecem através da membrana envolvente e interpretadas por Blanchard e Dufour como orgãos copuladores, quitinizados, serviriam na realidade apenas como "armações" internas, para manter o conjunto de órgãos em sua posição normal.

Chamou ao conjunto de "órgãos paraxiais" (Paraxialorgane).

Os verdadeiros órgãos copuladores residiriam no fim do conduto ejaculador, por entre os dois opérculos genitais e seriam visíveis, quando êstes forem destacados. Apresentam-se sob a forma de dois delicados apêndices, não articulados.

Êstes mesmos apêndices já tinham sido descritos, aliás, muito antes de Pawlowsky, por Narayanan (10) numa espécie de *Heterometrus*. Pesquizando a região genital externa, descreveu êste autor os "músculos depressores operculi", de percurso dorso-ventral e que recolocariam os opérculos e os dois apêndices em sua posição normal, ao passo que um outro feixe, o "adductor", com percurso transversal, manteria fechada a entrada genital, ficando os dois apêndices cobertos pelos opérculos.

O prestígio de Pawlowsky foi suficientemente grande, para que sua opinião fosse abraçada, sem maior discussão, tanto por Birula (11) como por Werner (2), que apresentou em sua obra, à página 157, as figuras N. 126 e 127, com os dois apêndices, designados por ele de "Kopulationszangen". Não pôde deduzir, entretanto, como poderiam funcionar no acasalamento, já que, macroscopicamente, em preparações totais e em cortes, não se podia ver nenhum canal eferente ou outra perfuração, a possibilitar uma eventual transmissão do esperma.

Nos últimos anos resurgiram opiniões em favor da velha hipótese de Blanchard e Dufour. Vachon (3) interpretou as formações de côr escura, que podem ser vistas nos machos, quando se suspendem os dois opérculos, como sendo as porções apicais, quitinosas, dos órgãos copuladores, que repousam naturalmente em bainhas. Pela ação muscular e pressão sanguínea poderiam as duas "lames peniales" vir a aflorar fàcilmente pela câmara genital e a constituir, após juxtaposição, uma única peça, o pênis. O esperma fluiria por êste orgão ôco.

Piza, influenciado possivelmente por Werner, não deixou de aludir aos apêndices copuladores externos de *Tityus bahiensis* (5), mas insurgiu-se no mesmo trabalho contra a terminologia de Pawlowsky. Os "orgãos paraxiais" são um mero "nomen nudum". Existe realmente um órgão copulador, que repousa numa membrana e que deve chamar-se de pênis (5).

Em um segundo trabalho (6) veio a descobrir que são dois órgãos copuladores, um de cada lado do pre-abdomen, e que os mesmos poderiam ser extraídos.

com pinça ou por meio de eletro-choque de escorpiões vivos. O órgão que vinha, então, à tona era na realidade constituido pela fusão intima dos dois órgãos internos. A verdadeira terminologia seria, portanto, de "pênis" para o órgão definitivo e de "hemipenes" para os dois órgãos parciais, sediados em suas respectivas bainhas. No momento da emissão estabelecer-se-ia a fusão dos dois, vindo a constituir um tubo ôco, transmissor do esperma. A união seria tão completa que, "não fosse a constatação prévia, jámais se poderia suspeitar de sua duplicidade".

Piza e Vachon, trabalhando um com o *Tityus bahiensis* do Brasil e o outro com escorpiões peçonhentos da África do Norte, vieram, pois, em completa independência um do outro, a reconfirmar a opinião de Blanchard e Dufour contra Pawlowsky, Birula, Werner e outros.

Piza (7), entretanto, viu-se em frente a uma nova dificuldade: — Como se daria, após o acasalamento, a separação dêste tubo em suas metades originárias? Embora tivesse examinado machos, destituidos totalmente de hemipenes e apesar de ter visto que os mesmos "poderiam abandonar êste órgão pelo chão", insistiu o autor na separação do pênis, após o acasalamento e no recolhimento das duas metades em seus depósitos naturais (7).

No tocante ao *acasalamento* houve meras conjeturas de lado a lado, pois ninguêm o tinha observado até hoje. Todos que escreveram sôbre o assunto, insinuavam que haveria duas fases:

a) a do "prelúdio" nupcial;

b) a do acasalamento propriamente dito.

O primeiro encontrara a pena magistral do naturalista Fabre (12) que viu o ponto culminante do prelúdio no que ele chamou de "promènade à deux" de "arbre droit". A cauda dos dois parceiros se elevaria verticalmente, passando o macho a agarrar a companheira com as pinças e passeando o casal em marcha compassada para a frente e para trás. Terminado o prelúdio, refugiar-se-iam os dois num abrigo impenetrável ao olhar humano, vindo a surgir, mêses depois, sòmente a fêmea, já com numerosos filhotes nas costas.

Werner (2) escreveu o seguinte: "Über die Art und Weise der Kopulation ist bei der nächtlichen und verborgenen Lebensweise dieser Tiere nichts bekannt geworden. Jedenfalls kann sie nur so vor sich gehen, dass sich die beiden Tiere *mit der Ventralfläche berühren*, wobei das Weibchen vom Männchen mit Hilfe der beiden Kopulationszangen festgehalten wird. Als eigentliche Kopulationsorgane kann man diese nicht bezeichnen, da sie in Ermangelung einer Rinne oder eines Kanals zur Leitung eines flüssigen Spermasekretes nicht geeignet sind. Andererseits wissen wir durch Pawlowsky, dass das Sperma in Form einer *Spermatophore* übertragen wird. Es ist möglich, dass sich die

Tiere während der Paarung aneinander *vertikal aufrichten;* ebenso ist es aber auch möglich, dass sie dabei *aufeinander liegen.*"

Vachon (3) admitiu: "On ne connait que peu de chose sur les moeurs nuptiales des scorpions malgré les observations de nombreux chercheurs et il n'est point prouvé que le peu que l'on sache chez *Buthus occitanus* corresponde à ce qui se passe chez les autres espèces. Toutes recherches dans ce domaine seraient donc les bienvenues. Chez les scorpions, après un prélude, un véritable accouplement a lieu, à la faveur duquel le mâle introduit directement le sperme à l'intérieur des voies génitales femelles."

Para Piza (7) seria plausível a seguinte hipótese: "No acasalamento deve o pênis penetrar diretamente na câmara genital feminina. A união entre os dois sexos deve ser tão íntima que não possa haver contacto do esperma com o ar. Pois êste contacto, ainda que por um momento só, solidificaria o líquido seminal e faria com que os dois hemipenes ficassem definitivamente fundidos numa só e inseparável peça, a impossibilitar, após a cópula, sua separação e retração para as respectivas baínhas."

Nada de concreto, entretanto, foi observado. Para Vachon "le mystère reste entier." Fabre (12) vira uma única vêz que o macho ficava *por baixo* de uma fêmea. Maccary (13) julgara ter visto um macho *"cavalgar"* uma fêmea. Vachon opinou que o pênis se quebraria total — ou parcialmente, permanecendo um pedaço na vulva.

Existe realmente na vulva da maioria das fêmeas fecundadas uma pecinha quitinizada, com a forma de um "Y" invertido, penetrando as hastes pelos dois ovidutos. Esta peça já era conhecida pelos antigos autores e foi designada com o termo de *"spermatocleutrum"*. Até hoje, entretanto, não pôde ser explicado se o mesmo era de procedência masculina ou formado pelos próprios órgãos genitais da fêmea. Segundo Pawlowsky, a peça serviria de tampão, a impedir o refluxo do esperma. Vachon aventou a hipótese de que, na cópula, o macho transmitiria primeiro o esperma, incluso ou não num espermatóforo, e depois o *spermatocleutrum,* como fecho da vulva, a tornar impossível mecanicamente novo acasalamento.

MATERIAL E MÉTODO

O aparelho reprodutor masculino foi estudado comparativamente em 47 *Tityus trivittatus* e em 228 *Tityus bahiensis.* Todos êstes escorpiões e muitas centenas mais se encontravam ou se encontram ainda hoje vivos nos laboratórios do Instituto Butantan.

Iniciando-se a incisão na zona lateral do última placa ventral do pre-abdomen do animal recém-morto e prosseguindo-se o corte pelos lados, ao

longo das coxas das pernas, em direcção ao esternito, pode destacar-se fàcilmente toda a chapa ventral. Para que não haja ruptura dos condutos genitais, na altura dos opérculos, pratica-se ainda uma incisão circular em tôrno dêstes. Submergindo-se, então, o escorpião em solução de Ringer ou num líquido fixador (preferimos o Dubosq-Brasil), podem desprender-se os "lobos hepáticos" envolventes e libertar totalmente o aparelho genital com os órgãos anexos.

Os órgãos isolados e fixados foram cuidadosamente seccionados e montados, após desidratação, em bálsamo do Canadá ou incluidos em parafina, cortados ao micrótomo, corados pela hematoxilina-eosina ou ainda segundo os métodos de Mallory e de van Gieson e montados igualmente em bálsamo do Canadá. Para melhor interpretação preferimos cortar separadamente glândula por glândula e peça por peça, obtendo desta maneira cortes seriados dos testículos, das bainhas com os hemipenes, de um trecho da glândula cilíndrica, da ampôla do *vas deferens,* da vesícula seminal e dos dois pares de glândulas, o oval e o anterior, acessório.

Também foram feitas preparações totais dêstes mesmos órgãos, coradas ou não com carmim borácico.

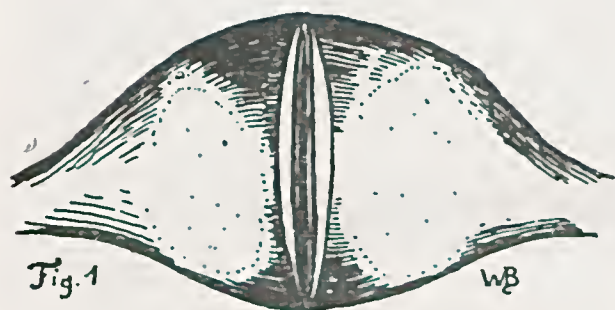
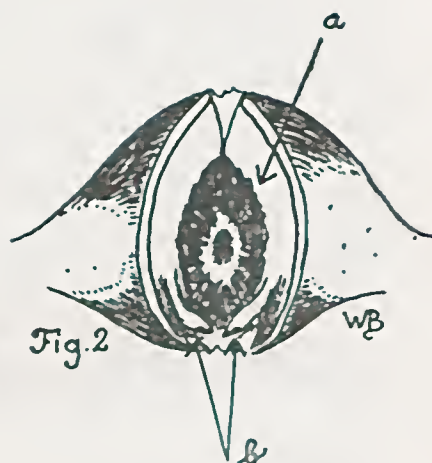
Na mesma orientação de trabalhos foram necropsiados até agora nada menos de 425 exemplares de *Tityus serrulatus,* sem que tivéssemos podido encontrar um único macho sequer!

Para facilitar a observação do prelúdio nupcial e do acasalmento foram improvisados viveiros com fundo de vidro. Com lente de aumento módico podíamos verificar, então, o que realmente se passa nesta fase da vida do escorpião.

NOVAS PESQUISAS

Os machos das duas espécies são reconhecíveis pelas grandes mãos, amarelas em *Tityus trivittatus* e pela base dos dedos separados por uma excavação oval em *Tityus bahiensis.*

Suspendendo-se os dois opérculos genitais (Fig. 1), observam-se na entrada da fenda genital, nas duas espécies, os dois pequenos apêndices cilíndricos, designados por Werner de "Kopulationszangen", por Pawlowsky de "orgãos copuladores", Vachon de "crochet du copulation". Para evitar maior confusão terminológica, propomos o nome definitivo de *"styli genitales externi".* São revestidos por uma delicada camada cuticular, pouco quitinizada. Não são articulados e atingem as dimensões de 1 mm de comprimento por 0,2 mm de espessura. Os músculos *"adductores"* e *"depressores"* dos opérculos comandam igualmente a ereção ou retração dos *styli genitales externi.* Além da estrutura costumeira do tegumento escorpiônico não encontrámos nenhum ele-

mento novo nos dois apêndices. A epidermis consiste em uma só camada de células cilíndricas, com os núcleos distribuidos na parte basal. A membrana basal é simples. Há muitas glândulas cutâneas. Devido ao mesmo colorido do ambiente, não se podem distinguir fàcilmente os dois apêndices. Quando a câmara genital estiver fechada, são invisíveis externamente (Fig. 2; a).

Tityus trivittatus: opérculos genitais em posição normal (25 x).

Tityus trivittatus: Opérculos genitais entreabertos: a) Fenda genital; b) *styli genitales externi* (25 x).

Os *testiculos* de *Tityus trivittatus* constituem um tubo esbranquiçado em forma de "U", com um ramo longitudinal mediano e mais três a quatro ramos transversais, anastomosados (Fig. 3; k). Em exemplares jovens existem sòmente dois tubos anteriores que, aos poucos, se extendem cada vêz mais para trás, até que estabeleçam a união na área do último segmento preabdominal. No ponto, onde os dois testículos se encontram e se soldam, persiste um septo divisório. O calibre testicular é quase sempre o mesmo. As anastomoses transversais surgem mais tarde e parecem partir do ramo mediano, seguindo em direção ao tubo lateral. Primeiro se estabelece a anastomose posterior, depois a segunda, seguida pela terceira, podendo, em exemplares com grande atividade gametogênica, vir a formar-se ainda uma quarta anastomose total ou parcial, anterior. A desembocadura desta última dá-se na secção testicular, que corresponde topograficamente aos vasos deferentes.

Em *Tityus bahiensis* temos observado o mesmo. Verifica-se, pois, nas duas espécies estudadas um facto curioso: — Um trecho do vaso deferente se transforma em tubo testicular com atividade gametogênica e anatomicamente igual ao restante testículo. Êste mesmo trecho, entretanto, continua a exercer o papel de *vas deferens,* pois conduz os espermatozoides à vesícula seminal.

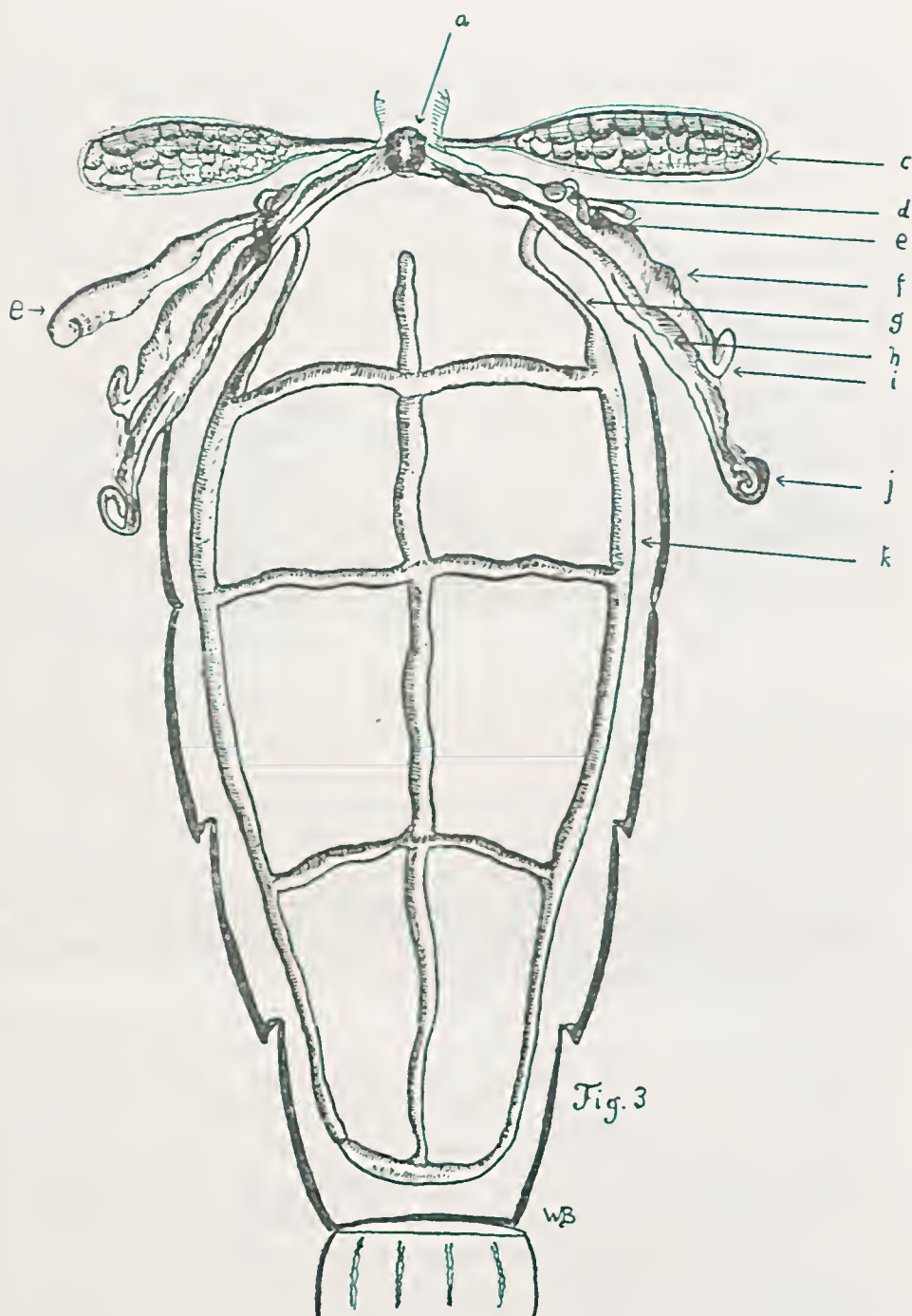
A contextura anatômica dos testículos é muito parecida com a das aranhas caranguejeiras. Há inúmeros folículos, separados uns dos outros por um "peritôneo". Em cada folículo ha novamente uma série de repartições, dispostos radialmente em torno do lumen central. Um septo conjuntivo separa as repartições, podendo ver-se, em umas, espermatogônias; em outras, espermatócitos de 1a. ou de 2a. ordem; em outras, espermátidas. Em outras tantas repartições, finalmente, vêem-se espermatozoides imaturos, quase maduros e, por último, os espermatozoides maduros, com longos filamentos caudais e em disposição unipolar, isto é, com as cabeças dirigidas para a parede distal da repartição e os flagelos em direcção ao lume central.

Os dois *vasos deferentes* (Fig. 3; g) conduzem o produto dos tubos testiculares às bolsas seminíferas. Formam tubos largos nas porções basais. (Segue-se um trecho intermediário com menor calibre). Descrevem, então, uma volta em torno da glândula cilíndrica e das baínhas. Alargam-se novamente e desembocam nas vesículas seminais por meio de um alargamento, denominado de "ampôla". Apenas a parte intermediária, mais estreita, não exerce função gametogênica. As porções posterior e anterior e a ampôla apresentam a mesma anatomia dos folículos testiculares, com ativa produção de espermatozoides.

Em alguns exemplares de *Tityus bahiensis* temos visto mais outro apêndice ôco, ao lado da ampôla e que serve igualmente à armazenagem dos espermatozoides, merecendo, por isso, a designação de "vesícula seminal acessória" (Fig. 6; m).

Pelo estudo comparativo dos vasos deferentes em diversos exemplares, com idades diferentes ou em estação anual diversa, chega-se à conclusão de que as dimensões, a formação da ampôla ou da vesícula seminal secundária e ainda a existência de trechos com função gametogênica, variam muito de indivíduo para indivíduo e dependem também do ciclo vital e da época do ano. Ao conjunto dêstes fatores estão condicionados um maior desenvolvimento ou a involução temporária. Em volta da ampôla e da vesícula secundária ha um envólucro, constituido por fibras musculares circulares, mais espessas no local da desembocadura do vas deferens e formando uma espécie de constrictura ou esfíncter.

A *vesícula seminal* (Figs. 3 e 5; e) é de forma oblonga. No meio ha geralmente um estrangulamento. Uma camada de feixes musculares rodeiam-na. O peritôneo é relativamente espesso e as células epiteliais, com os núcleos em posição basal, apresentam-se como cilindros muito estreitos e longos, com o citoplasma finamente fibrilar. O canal eferente é curto e desemboca na glândula cilíndrica.

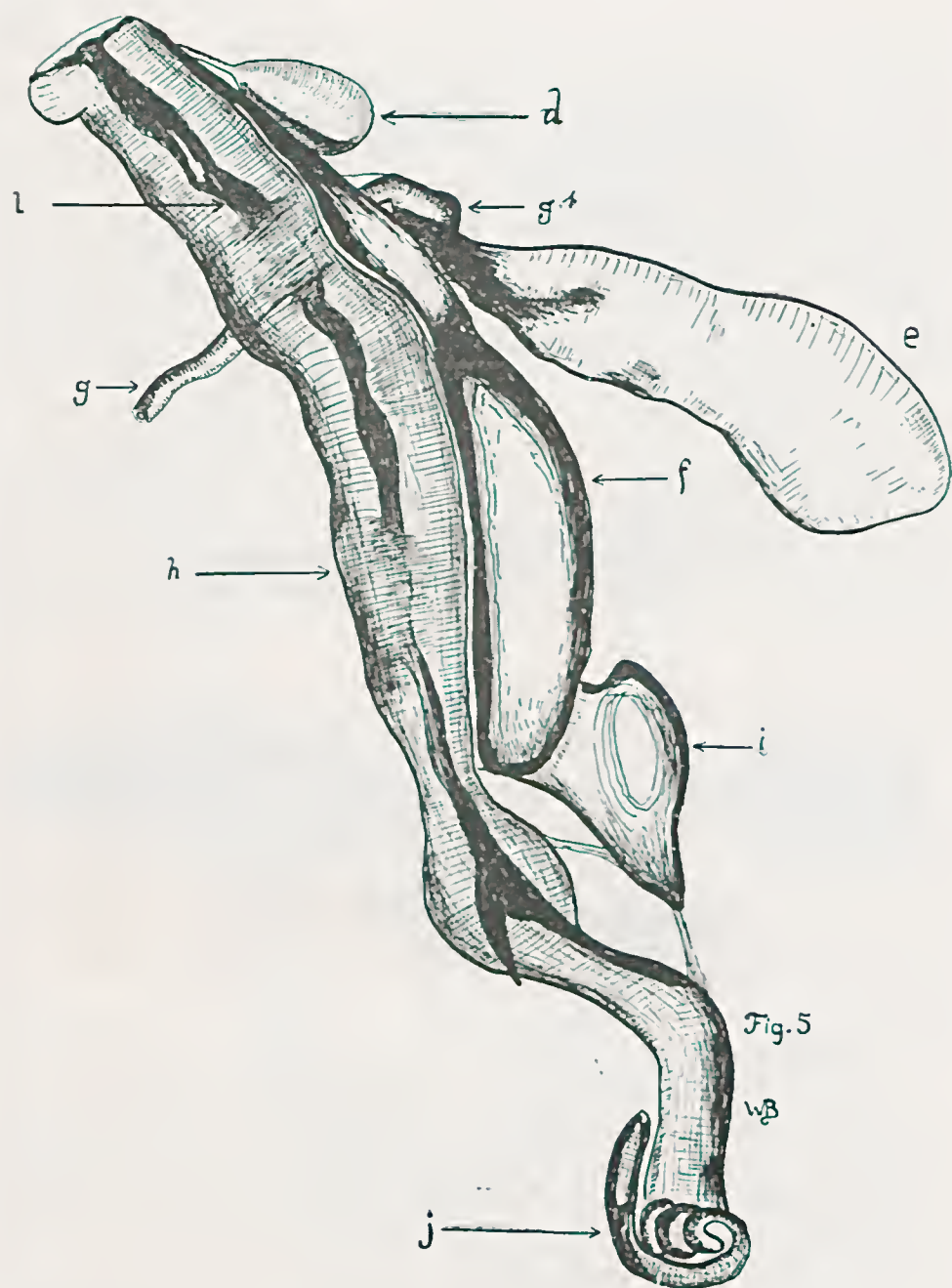
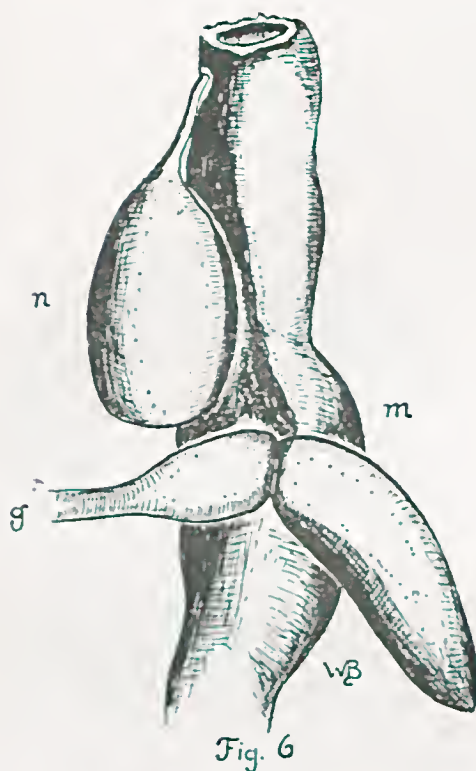
A *glândula cilíndrica* (Figs. 3 e 5; i Fig. 6) é muito maior do que a vesícula seminal. Constitúi uma formação alongada, sinuosa, adaptada dorsalmente à

Tityus trivittatus: Esquema do aparelho genital masculino: a) fenda genital; c) glândulas acessórias anteriores; d) glândula oval; e) vesícula seminal; f) glândula cilíndrica; g) *vas deferens*; h) baínha do órgão hemipenial; i) parta distal da glândula cilíndrica; j) parte distal do órgão hemipenial; k) testtículos (20 x).

silhueta da baínha do hemipênis, em cuja reentrância é encaixada e mantida por meio de feixes musculares de ligação. Sua parte posterior é quáse triangular. No meio, à altura da vesícula seminal, é entumecida (Fig. 5; f) e, em frente, é afinada. Na porção triangular vê-se macroscopicamente uma espécie de lumen transparente que contém quase sempre um filamento de colorido quase negro e cuja significação não pudemos averiguar. A ponta distal é unida à zona flagelar da baína do hemipênis por meio de robustos feixes musculares. A glândula cilíndrica tem um longo canal eferente, que conduz, além das eliminações da própria glândula, o conteudo da bolsa seminífera ao conduto ejaculador, em que desemboca. Também esta glândula é rodeada por feixes musculares, mais robustos na porção distal e em torno do canal eferente. Seu epitélio consise tme células cilíndricas com o citoplasma finamente fibrilar e os grandes núcleos em posição basal.

Em frente à vesícula seminal, encostada à parte anterior da glândula cilíndrica, localiza-se a *glândula oval* (Figs. 3 e 5; d. Fig. 6; n), cuja forma externa faz jús ao nome. Rodeada por delicados feixes musculares circulares, com o epitélio cilíndrico disposto radialmente em torno do lume central, relativamente

Tityus trivittatus: Corte através do conduto ejaculador, com as glândulas anteriores: l) porção anterior do hemipênis; h) baínha hemipenial (40 x).

volumoso, parece eliminar um produto importante para o prolongamento da vida dos espermatozoides. Seu canal eferente é muito longo e fino e acompanha de perto o percurso do mesmo da glândula cilíndrica, desembocando os dois, um ao lado do outro, na parte inferior, lateral, do conduto ejaculador, exatamente na região da cabeça dos hemipênes.

Do lado externo da glândula cilíndrica encontra-se o *órgão transmissor* do esperma à fêmea, um de cada lado. Dufour, Blanchard, Piza e Vachon designaram a êstes dois órgãos com os nomes de pênes, órgãos copuladores, hemipênes.

Tityus trivittatus: Parte dos órgãos genitais masculinos (40 x); (designações das partes como na fig. 3).

Tityus bahiensis: Trecho da glândula cilíndrica: g) ampola do *vas deferens:* m) vesícula seminal acessória; n) glândula oval (50 x).

Tityus trivittatus: Hemipênis (retirado da bainha): l) parte quitinizada; j) flagelo (36 x).

Para não criar maior confusão terminológica e por simples conveniência continuamos a denomina-los de *hemipenes*. Cada um está envolto por uma membrana, denominada de *"baínha"* (Figs. 4 e 5; h) e que é a simples continuação bifurcada do conduto ejaculador. Tanto as duas baínhas como os dois hemipenes chegam a atingir quase 1 cm de comprimento por 0,3 cm de largura. As baínhas estreitam-se abruptamente na parte distal, vindo a formar uma espécie de tubo enovelado (Fig. 8). No canal interno, com aspecto de meia lua em corte transversal, repousa o *hemipênis*.

Êste apresenta-se como uma metade de tubo. Sua parte anterior é larga e quitinizada (Fig. 7; 1), enquanto que no fim termina num flagelo dedicado e elástico (Fig. 7; j). A "cabeça" apresenta uma camada de quitina muito fina, com um reforço quitinizado na borda externa. A zona intermediária apresenta rebordos laterais ligeiralmente revirados. No terço posterior há novamente um refôrço quitinizado, saliente e bifurcado, dirigindo-se um ramo para trás, enquanto que o lateral, sob a forma de um acúleo pontudo o recurvo, chega a perfurar com a ponta a própria baínha. A cauda ou "flagelo" é fino, sem quitina, muito elástico, repousado igualmente dentro da porção mais adelgaçada da baínha (Fig. 8).

A própria situação topográfica elucida a origem dos órgãos copuladores. As duas baínhas são o resultado de uma profunda invaginação do tegumento externo. Os hemipenes, como porção interna da formação invaginada, correspondem em sua estrutura anatômica, quitinizada, exatamente à epi-e exo-cutícula. A membrana, que delimita o lume do conduto ejaculador e de sua continuação, formada justamente pelas duas baínhas, contém os elementos da endo-cuticula. O epitélio destas baínhas vem a corresponder exatamente à epiderme do tegumento. A delicada membrana externa das baínhas e do conduto ejaculador pode ser identificada como a *"membrana basalis"*.

A estrutura anatômica da parte mais larga dos hemipenes, de facto, revela sua natureza essencialmente cuticular. Toda vez que estas 2 peças são definitivamente perdidas no acasalamento, incumbem-se os epitélios das baínhas a segregar substâncias, que vêm a formar novamente estas peças, tal como a epiderme segrega os elementos da nova cutícula em cada écdise.

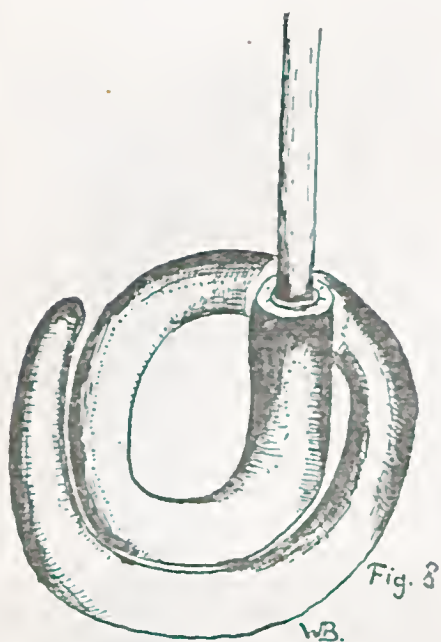
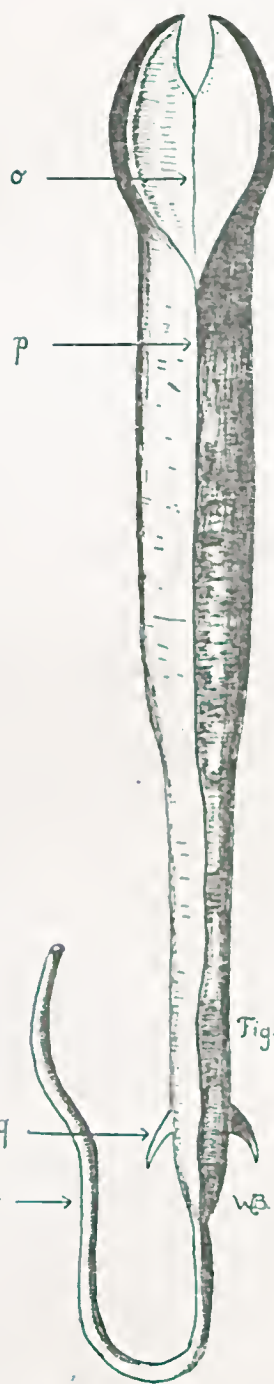
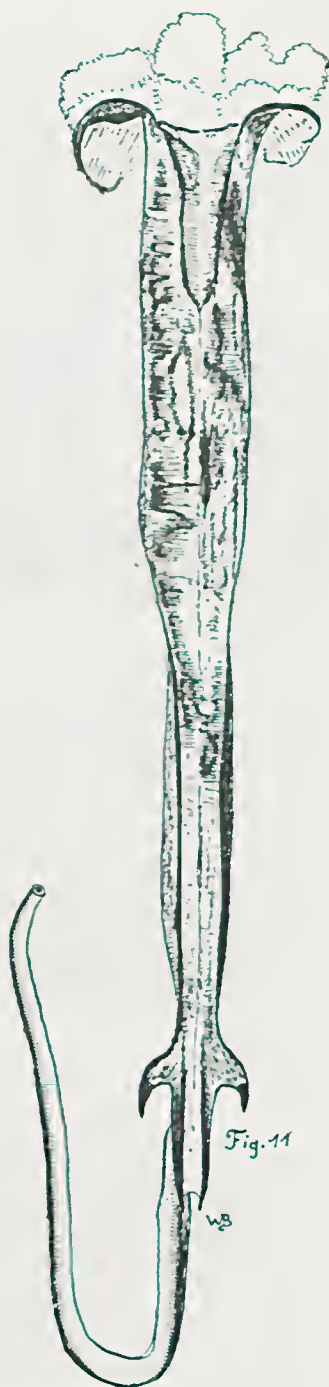
A figura 4 apresenta esquematicamente a fenda genital, com os 2 *"styli genitales externi"*, a parte do conduto ejaculador aberta e as porções anteriores das 2 baínhas (h), que formam a continuação direta dêste. Em seu lume aberto vêem-se as porções anteriores dos 2 hemipenes (1). A disposição dêstes é tal, que, ao afluirem ao conduto ejaculador, unem-se, encaixando-se uma metade perfeitamente na outra (Fig. 7), vindo a formar o verdadeiro órgão copulador, o pênis (Figs. 9; 10; 11). Na figura 9 podem observar-se ainda as duas suturas dos primitivos hemipenes (9; p), bem como o par de acúleos laterais (q).

Tityus trivittatus: Flagelo hemipenial, parcialmente envolto ainda pela baínha (65 x).

Tityus trivittatus: Órgão copulador, resultante da fusão dos dois hemipenes: o) sutura inferior; p) sutura superior; q) acúleos laterais; i) flagelo (36 x).

Fig. 10 *Tityus trivittatus*: Órgão copulador com o flagelo caudal distendido (7 x).

WB

Tityus trivittatus: Órgão copulador, aspecto superior (36 x).

Fig. 11

WB

O corpo do pênis vem a formar um tubo ôco, aberto na face dorsal anterior. Quanto ao resto está o pênis completamente fechado.

As duas bainhas estão rodeadas por feixes musculares circulares. Êstes músculos formam camadas ainda mais espessas na área do conduto ejaculador, onde, além disso, há um poderoso músculo, de percurso vertical, que recobre o fundo do conduto ejaculador. A contração dêste feixe repercute vivamente no próprio conduto ejaculador que expulsa violentamente o seu conteudo.

Na porção anterior do *"ductus ejaculatorius"* desembocam os dois canais das duas *glândulas acessórias anteriores* (Figs. 3 e 4; c), de colorido amarelado. Seu epitélio é de natureza glandular e o produto, eliminado por êste epitélio, é depositado justamente na parte anterior dos dois hemipenes, no momento de sua emissão e serve de "cola", para determinar a firme adesão das duas metades e ainda para fixar o pênis projetado sôbre o solo.

A julgar pela localização topográfica do conjunto de canais, que desembocam no conduto ejaculador, devem afluir a esta câmara as seguintes excreções:

a) um liquido gomoso, que se solidifica em contato com o ar e que promove a fusão dos 2 hemipenes e a fixação do pênis sôbre o solo. É eliminado pelas 2 glândulas anteriores.

b) um líquido (que serve para manter vivos os espermatozoides) das glândulas ovais.

c) o próprio líquido seminal com os espermatozoides, das vesículas seminais.

d) uma excreção, provinda das glândulas cilíndricas.

O conteudo de todos estas glândulas é esvaziado concomitantemente, verificando-se logo em seguida a penetração dos 2 hemipenes na mesma zona. No momento da juxtaposição das 2 lâminas, enche-se seu espaço interno com os produtos glandulares, de maneira que o órgão copulador definitivo, ao ser projetado para fóra da fenda genital, já se acha "carregado" com os liquidos seminais.

b) Acasalamento:

A iniciativa no acasalamento nas duas espécies estudadas aqui cabe ao macho, geralmente mais robusto do que a fêmea. Verificamos que o processo pode ser resumido em três fases:

a) a da escolha da companheira;
b) a do prelúdio nupcial;
c) a do acasalamento pròpriamente dito.

Na *escolha da companheira* devem influir "certos fatores de cio", pois o macho passa muitas vêzes rente a uma fêmea, sem importar-se com a mesma, ao passo que, chegando perto de uma outra, manifesta incontinente interesse sexual. O "cio" está ligado, entre outros momentos, ao fator "tempo", restrito nas duas espécies aos mêses da primavera e começo de verão (outubro a dezembro). Fóra dêste tempo convivem os machos com as fêmeas, sem manifestação sexual alguma. Mas mesmo na época do cio há fêmeas, geralmente em começo de prenhez, que não são absolutamente importunadas. Às vezes um, dois ou mesmo três machos escolhem a mesma fêmea. O primeiro a chegar apodera-se das mãos da parceira e coloca-se em posição normal de acasalamento. Os outros agarram qualquer parte proeminente da mesma, uma das pernas ou a cauda. Iniciando-se, então, a "promènade à deux", neste caso "à quatre", toma o macho da posição normal a iniciativa, seguindo o restante da tribu mais ou menos de arrastão. A fêmea não ensaia resistência alguma, sendo puxada para a frente ou empurrada para trás. O macho "dianteiro" está empenhado em fazer desistir os companheiros, e toda a vez, que se lhe oferece ocasião, desfere vigorosos golpes contra os mesmos, empregando o ferrão. Consegue finalmente seu intento e os outros desistem, cabendo a fêmea exclusivamente a êle, como trofeu de seu vigor.

A *luta pela fêmea* não constitúi, entretanto, a regra, pois o número destas parece exceder, nas duas espécies, o dos machos. Mas mesmo assim nunca temos observado que as fêmeas tomassem a iniciativa ou brigassem por causa de um macho. O aparente desequilíbrio entre os dois sexos tem sua razão de ser. A fêmea, uma vez fecundada, pode guardar em seus receptáculos seminais os espermatozoides por mais de um ano ou, provavelmente, por mais tempo ainda, de maneira que, sem novo acasalamento, pode parir filhotes durante um, dois ou mais anos. Em várias dezenas de necrópsias de fêmeas das 2 espécies temos constatado nos ovários embriões quase que completamente desenvolvidos e prestes de virem a nascer, enquanto que em outros trechos ovarianos havia fases embrionárias ainda em começo ou apenas ovos nas primeiras divisões celulares. Não poucas vezes viam-se apenas um ou dois embriões grandes e todo o resto dos ovários era tomado por ovos recém-fecundados. Esta fecundação é feita pela própria fêmea, ao que parece e não haverá mais novo acasalamento, enquanto durar o estoque dos espermatozoides, armazenados provavelmente nas porções anteriores dos ovidutos.

O macho, entretanto, entra em cio anualmente, podendo, portanto, acasalar-se cada ano com outra fêmea. Portanto, mesmo um número três vêzes menor de machos, como parece ser, mais ou menos, em *Tityus bahiensis* e *T. trivittatus*, garante o equilíbrio entre os sexos e a supervivência da espécie.

Situações anômalas, que um macho agarre outro macho menor e inicie com êle a permabulação, também foram vistas, mas em pouco tempo é descoberto o engano e os dois se largam.

Escolhida a companheira inicia-se o *prelúdio nupcial*. Macho e fêmea estão colocados frente a frente, testa contra testa (Foto 1), segurando o macho com os dedos as mãos da eleita. Pode ser que no primeiro golpe da escolha seja apreendida a cauda ou uma perna. Então, o macho passa para a frente, segu-

FOTO 1 — *Tityus bahiensis*: Pausa, durante a "romènade à deux" (o macho dando alimento à fêmea).

rando successivamente com as mãos ora uma perna ora outra, até que fique em posição dianteira. A fêmea não ensaia nenhum gesto de resistência.

O prelúdio nupcial é um passeio a dois, em marchas longas, para a frente e para trás ou para os lados, ora aos empurrões, ora puxando a companheira que se deixa dirigir, presa pelas mãos entre os dedos do macho. Colocando-se pequenos obstáculos no caminho dos dois, por exemplo, pedrinhas ou um pouco d'agua (êles não gostam de entrar diretamente na agua), verifica-se que a fêmea, mesmo em marcha a ré, está atenta ao caminho, apalpando o mesmo com as pernas ou desviando-se hYbilmente da poça d'agua ou da pedrinha. Embora passiva, está, contudo, alerta e acompanha o passeio forçado, enpregando as próprias pernas na locomoção. A marcha ora é mais rápida, com pausas bruscas intercaladas, ora é lenta e comedida. Nos intervalos o macho procura

agradar à fêmea, dando-lhe uma papa alimentícia, regurgitada pelo esófago. De vêz em quando dá umas "cabeçadas" contra a fronte da fêmea.

Nesta fase formam os dois uma figura bastante simétrica, com as mãos quási paralelas ao eixo do corpo, os fêmures horizontais, as pernas de um formando a figura de espelho do companheiro, as caudas parcialmente enroladas ou ligeiramente elevadas ou ainda deitadas ao lado (Foto 2).

FOTO 2 — *Tityus bahiensis*: "Promènade à deux".

O corpo do macho é periòdicamente sacudido por violentos tremores; seus pentes se encontram em contínuos movimentos giratórios; suas pernas anteriores, quási não empregadas na locomoção, executam movimentos vibratórios sob os opérculos genitais da fêmea, provocando nela, aos poucos, um excitamento.

Colocados os dois sobre uma placa de vidro, a dificultar a sua marcha, mantêm a fêmea as pernas imóveis, deixando-se empurrar ou arrastar pelo companheiro.

Por esta caminhada "a dois" procura o macho encontrar um *local propício* ao acasalamento. Contràriamente do que faziam supor as publicações a respeito, não se refugiam os dois num esconderijo, impenetrável ao olho humano. Nenhuma vez houve acasalamento sob os esconderijos, que se encontram em profusão nos viveiros dos escorpiões; pelo contrário, os que repousavam ai, vinham para fóra, em procura de uma companheira, acasalando-se a descoberto.

As caminhadas podem perdurar até uns 10 ou 15 minutos e o casal dá a volta diversas vezes a um viveiro de 4-6 metros de circunferência, intercalando frequentes pausas, em que o excitamento do macho se torna cada vez mais vivo e mais rápidos ficam os movimentos vibráteis de seus pentes e pernas anteriores. Com o progresso do excitamento dos dois, entumece a região dos opérculos genitais, chegando mesmo a aparecer a fenda genital, àvidamente friccionada pelas pernas do macho.

Enquanto se escolheu um local apropriado e a vulva da fêmea está distendida e apta a receber o líquido fecundante, chega o excitamento do macho ao auge. Os movimentos vibratórios já se estendem também ao 2.º par de pernas; a cauda é periòdicamente sacudida convulsivamente. O passeio consiste agora apenas em uns 10 passos para a frente e os mesmos para trás, de maneira que, nos intervalos, repousam os dois no logar escolhido para o acasalmento.

Nesta fase eleva-se a cauda do macho verticalmente (Foto 3). Os últimos segmentos do pre-abdomen acompanham os movimento convulsivos. A cauda da fêmea, entretanto, não acompanha esta elevação. Em meio de um grande

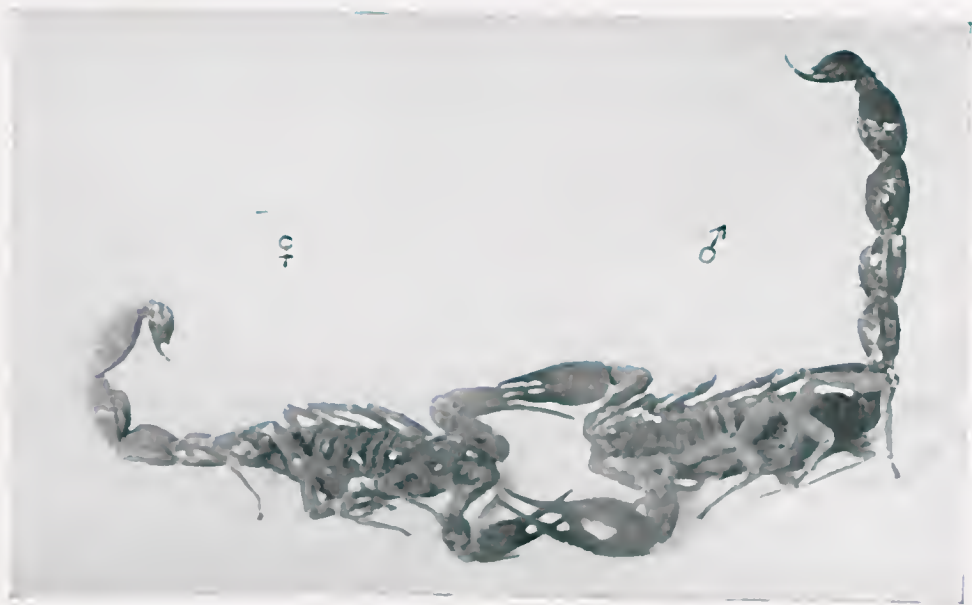



Foto 3 — *Tityus bahiensis*: Fase do "arbre droit", em que o macho projeta o órgão copulador.

esforço, com a cauda na posição de "arbre droit" (segundo Fabre), verificam-se no macho veementes ondas convulsivas, a percorrer a cauda desde o ferrão e descendo gradativamente por todos os artículos em posição vertical.

É justamente êste o momento do descarregamento simultâneo, sob a influência da pressão aumentada nos órgãos, de todas as glândulas sexuais e dos próprios hemipenes. Êstes se unem, ao passarem pelo conduto ejaculador, no órgão copulador definitivo, que conduz em seu canal, como já foi dito, o líquido seminífero.

Pelo concurso do sistema muscular que recobre as baínhas, o conduto ejacular e a região dos opérculos genitais, com a ajuda ainda da pressão sanguínea aumentada ao máximo, é o pênis arrojado para fóra da fenda genital do macho: descreve uma trajetória de 4-6 cm de extensão e atinge finalmente o solo diretamente sob a vulva da fêmea. Por meio da "cola", provinda das glândulas anteriores, fixa-se definitivamente no solo. Seu flagelo caudal, entretanto, continua mesmo agora, ainda a manter contacto com as baínhas de origem. Êste flagelo é muito elástico, podendo ser esticado até 40 vezes seu comprimento natural, sem romper-se. (Fig. 10).

Após a emissão do órgão copulador verifica-se uma pausa, em que a cauda do macho volta à posição normal. Em seguida é reiniciado o "pasesio a dois", esta vez com passos comedidos e certos, sempre por cima do órgão copulador e de tal maneira que, em cada passagem, a massa dos espermatozoides chegue em contacto direto com a vulva da fêmea. A "promènade" abrange apenas uns 4 cm para a frente e para trás. Em cada retrocesso do macho é esticado o flagelo (pois o pênis está preso ao solo)e a fêmea chega em contacto com o esperma com sua vulva entreaberta; avançando o macho, volta o flagelo à condição normal, penetrando o pênis parcialmente pela fenda genital masculina, até onde o permitam os dois acúleos ou freios laterais, que se enganch†am nos *styli genitales externi*.

Sob pressão muscular apertam os *styli* a parte basal do órgão copulador, à maneira de uma bomba de pressão, jorrando, então, um novo jacto de líquido fecundante para a parte anterior do pênis.

O sentido pois, do vai-vem rítmico é o de "bombear" o líquido seminífero para a parte anterior do pênis (no avanço do macho) e o de fazer com que êste líquido penetre pela vulva da fêmea (no recuo do macho).

Que êste passeio a dois esteja absolutamente ritmado e como que com os avanços e recuos calculados exatamente, depende dos limites de elasticidade do flagelo caudal do pênis.

O passeio sôbre o órgão copulador dura, mais ou menos, 1 minuto apenas, com 5 a 10 contactos da fêmea com o mesmo. Em seguida parece esta despertar de sua letargia e tornar-se repentinamente ativa. Com repuxos vigorosos liberta as suas mãos do amplexo masculino e com os dedos passa a desferir alguns golpes enérgicos no companheiro, como a demonstrar-lhe que não mais está interessada na continuação do passeio.

Êste desiste prontamente e, no ato de virar-se, para seguir seu caminho, estica o flagelo caudal do pênis, preso sôbre o solo, até ao máximo, provocando minalmente sua ruptura.

Centenas dêstes órgãos copuladores foram vistos e examinados por nós e dezenas de vezes pudemos presenciar o acasalmento do *Tityus trivittatus* e *T. bahiensis*.

Necrópsias realizadas nos machos logo depois da cópula, revelaram que as baínhas estava vazias, sem os hemipenes. Entretanto, já depois de 6 a 8 semanas, são formados de novo pelo epitélio das baínhas.

APRECIAÇÃO DOS RESULTADOS

Não admira que até agora ninguêm tivesse podido observar o acasalamento dos escorpiões e a emisssão e perda do pênis. Muito poucos têm realmente tido ocasião em observar, anos a fio, maior número de escorpiões vivos, para a descoberta da "estação do cio". O pênis é relativamente pequeno e passa fàcilmente despercebido, pois fica geralmente encoberto pelo corpo ou do macho ou da fêmea. Descobrir êste pequeno órgão sôbre terreno arenoso, p. ex., afigura-se-nos quáse impossível.

Entretanto, está fóra de dúvida que, o que póde ser observado em *Tityus trivittatus* e *Tityus bahiensis*, deva valer também no tocante às espécies européias, africanas, asiáticas, estudadas por Pawlowsky e referidas parcialmente na introdução dêste estudo. As peças, minuciosamente descritas e designadas por êste autor de "órgãos paraxiais", se assemelham por demais com os órgãos copuladores de *Tityus bahiensis* e *T. trivittatus*, para que se pudesse pôr em dúvida sua natureza e função.

Aliás Vachon, Dufour e Blanchard, no tocante às espécies do Velho Mundo, e Piza, no tocante ao *Tityus bahiensis*, estão unânimes na rejeição do termo "órgão paraxial" (Pawlowsky, Birula, Werner, etc.), interpretando êstes órgãos como responsáveis pela transmissão do esperma.

A questão, se os espermatozoides seriam transmitidos à fêmea, inclusos em "*espermatóforos*" ou diretamente em "estado livre", não nos parece tão fácil de ser resolvida. Julgamos, pelo que temos visto até agora, que as duas modalidades podem existir e que será necessário pesquisar espécie por espécie. Pawlowsky, Werner e Vachon não se manifestaram de uma maneira muito positiva, afirmando ora que existiriam sempre espermatóforos e, em outro logar dos respectivos trabalhos, que seriam espermatozoides "livres".

Correlato a esta questão surge um novo problema: — o da fecundação dos óvulos. Será que no ato do acasalamento os espermatozoides migram através

dos ovidutos até a sede dos óvulos, fecundando a todos ou apenas a alguns? Ou será que eles ficam depositados nas 2 porções anteriores, mais largas, dos mesmos, mêses e talvez anos a fio, aguardando a sua vez de serem libertados e poderem ir de encontro a um trecho do ovário, coberto de óvulos?

Esta interessante questão aguarda ainda solução. Temos constatado realmente nas 2 espécies estudadas, que a fêmea não é fecundada todo o ano, embora parisse todo o ano uma média de 16 a 22 filhotes. Embora as necropsias tivessem revelado que, nesta fase, seu pre-abdomen esteja praticamente repleto com o volume dos embriões a nascer, ha, comtudo, trechos ovarianos, ao longo dos quais estão enfileirados, como contas de um rosário, inúmeros óvulos. Estariam êstes também já fecundados, esperando a sua vez para o início do desenvolvimento embrionário? A nós nos parece mais lógico, admitir-se no aparelho genital das fêmeas a existência de "receptacula seminalia", que seriam abertos toda vez que fosse necessário "fecundar" um outro número de óvulos.

Restaria a ser resolvido ainda o problema da "pasagem" dos embriões a nascer. São êles de grandes dimensões. Em sua passagem pelos ovidutos, distendem a êstes ao máximo, havendo o perigo de arrastarem consigo possíveis espermatóforos, que estivessem no caminho.

Quanto à interpretação dos *"styli genitales externi"* como apêndices orientadores da trajetória do pênis e auxiliarem para bombear o liquido seminífero para a frente, não pode haver dúvida. Gostaríamos que fosse conservada esta nossa terminologia, em logar de "Kopulationszangen" (Werner), "crochot du copulation" (Vachon), "apêndices copuladores" (Piza), para evitar a reincidência na interpretação errônea dêstes apêndices, descrita por Pawlowsky e outros.

A significação dos dois *"acúleos"* do pênis, descritos já por Blanchard, sem que êste autor tivesse podido explicar seu sentido, também está esclarecida. Servem de "freio", pois engancham-se nos 2 *"styli genitales"*, e impedem que o pênis torne a entrar pelo aparelho genital do macho nos avanços do acasalamento.

A suposição antiga e repetida sempre de novo, de que no acasalamento a fêmea teria a iniciativa e que esta arrastaria o macho para um esconderijo, impenetrável ao olhar humano, e que aí, após a cópula, ela devoraria implacavelmente o companheiro, aparecendo, mêses depois, sòzinha com os filhotes nas costas, não corresponde à verdade. Em nossos viveiros há muitos esconderijos, sob os quais os escorpiões se refugiam sempre e sem excepção durante o ano todo. Aproximando-se, porém, a estação do "cio", apodera-se da maioria deles uma inquietação, que faz, com que abandonassem os esconderijos, apesar de normalmente evitarem a lúz diurna, realizando-se o prelúdio nupcial e o acasalmento fóra dos "refúgios".

As hipóteses de Vachon (de que, durante a cópula, uma parte do pênis se quebraria, permanecendo os pedaços na vulva da fêmea) e de Piza (de que o macho introduziria diretamente o pênis na vulva da companheira e que, feita a transmissão do líquido fecundante, o órgão se desfaria novamente nos 2 hemipenes, alojados de novo em seus logares primitivos) não puderam ser confirmadas. O pênis é perdido em cada acasalamento. Esta perda não significa lesão alguma para os machos. As baínhas refazem, aos poucos, os 2 órgãos quitinizados, tal qual a epiderme refaz cada vez a nova cutícula nas écdises periódicas. Pelas necrópsias temos visto que, 4 a 6 semanas após o acasalamento, já estão refeitos os 2 hemipenes.

Poder-se-ia discutir a terminologia dêstes órgãos. Será apropriado chamar de "pênis" a uma peça, que resulte da fusão de 2 outras e que é perdida definitivamente em cada acasalamento? Não implica o termo "pênis" num órgão fixo e definitivo? Preferimos continuar a usar o termo, porque Dufour, Blanchard, Vachon, Piza o empregaram (embora achando que se trate de órgãos definitivos, i.é., que não se percam no acasalamento) e porque não encontramos outra designação no reino animal, já que não é cabível, pelas razões expostas, apelida-lo de "espermatóforo".

Quando dividimos o asalamento em três fases (escolha, prelúdio e cópula), o fizemos para poder expor o assunto com maior clareza. Na realidade, embora fosse sempre esta a ordem cronológica, as três fases são uma operação só. Escolhida a companheira, seguem-se manejos de excitamento mútuo (o macho dá alimento à companheira; os dois se dão "cabeçadas"; os órgãos genitais são apalpados, etc..) e de busca de um local apropriado, chegando, então, ao auge, o espasmo convulsivo do "orgasmo", com a emissão do pênis e a transmissão do líquido fecundante à vulva.

Um observador menos avisado veria apenas, durante todos êstes acontecimentos, primeiro um passeio a dois mais longo; depois restrito a um logar relativamente pequeno, com repetidas marchas em vai-vem; finalmente a erecção vertical da cauda e da parte posterior do pre-abdomen do macho; novas marchas dos dois, para a frente e para trás, agora ritmadas e de distância certa e, finalfente, a separação pacífica.

As observações amadureceram também uma interpretação satisfactória da significação do "*spermatocleutrum*". Consiste êste numa substância escura, como que uma "espécie de cola preta, endurecida" e que obstroi firme e totalmente a vulva das fêmeas *fecundadas*. Em fêmeas jovens, em não fecundadas ou nas que "entram em cio", não está presente. Quando nascem os filhotes, é esta massa amolecida por um liquido, eliminado pelo aparelho genital feminino, ficando removido para dar passagem aos filhotes. Em seguida, porém, forma-se novamente, tamponando a vulva.

A presença do *spermatocleutrum* impede realmente um novo acasalamento. Temos separado um lote daquelas fêmeas que, na época do cio, foram "desprezadas" pelos machos. Em todas elas havia o *spermatocleutrum*. Entretanto, mais ou menos 6 semanas depois, elas pariram, surgindo depois do parto um novo *spermatocleutrum*.

Êste é, portanto, de origem feminina, dirimindo-se com estas observações muitas hipóteses, aventadas por diversos autores. É ao mesmo tempo um indício de que a portadora dispõe ainda em seu corpo de esperma fecundante, não necessitando de um novo acasalamento.

Não pudemos averiguar ainda, si se verifica sòmente um único acasalamento durante toda a vida da fêmea. A relação numérica entre machos e fêmeas das 2 espécies estudadas e que é, mais ou menos, de 1 para 3, e o facto óbvio de que justamente esta relação garante harmoniosamente o equilíbrio biológico, com a garantia da sobrevivência da espécie, parece insinuar, salvo melhor juizo de mais competentes, que haja apenas um ou, no máximo, dois acasalamentos durante a vida da fêmea, a não ser que esta tenha vida muito longa, o que também ainda não está estudado em nenhuma espécie escorpiônica. Significativo nos parece o caso de *Tityus serrulatus*, que é um escorpião numerosíssimo em certas regiões do Brasil (Belo Horizonte, Ribeirão Preto, etc..), observado já há várias dezenas de anos e do qual ainda hoje não se conhece o macho. Entretanto, as fêmeas dos nossos viveiros parem anualmente. Uma só fecundação pelo macho, no começo da fase sexual da fêmea, tornaria plausível a ausência dêste ou sua enorme raridade.

CONCLUSÃO

Em *Tityus trivittatus* e *Tityus bahiensis* realiza-se o acasalamento pela transmissão do esperma, do macho à fêmea, por meio de um órgão copulador, o pênis, que é o resultado da união dos dois hemipenes, localizado cada um em sua respectiva baínha.

Durante a cópula é o pênis fixado sôbre o solo, levando em sua parte interna o líquido fecundante. Pelo vai-vem dos passos para a frente e para trás do casal, preso pelas mãos, e dirigidos por cima do órgão copulador, é o *"semen"* bombeado, aos poucos, para a parte anterior, aberta, do pênis, chegando em contato direto com a abertura genital de fêmea, quando esta roça com a vulva esta parte do órgão.

Finalizado o acasalamento, é o pênis abandonado sôbre o solo, cabendo aos epitélios das baínhas a neo-formação das lâminas peniais.

As dimensões, o aspecto externo e as estruturas histológicas dos testículos, dos vasos deferentes, da vesícula seminal e das glândulas anexas, são sujeitos a variações individuais, segundo maior ou menor atividade sexual do indivíduo.

O "*vas deferens*" das 2 espécies não corresponde ao que se entende geralmente sob esta designação, pois os dois tubos, além de conduzirem o líquido espermático às ampôlas seminíferas (verdadeiras ou secundárias), exercem igualmente atividade gametogênica, tanto na porção anterior como na posterior, revelando sua estrutura anatômica que também a parte intermediária pode desenvolver esta atividade.

Os espermatozoides obedecem, dentro dos folículos testiculares, a uma disposição unipolar, ao passo que, uma vez descarregados para o lumen central, testicular ou para dentro da vesícula, parecem estar distribuidos em feixes, com as cabeças e caudas orientadas a esmo.

A união dos sexos abrange um conjunto de manobras, cuja iniciativa cabe exclusivamente ao macho e que se desenrola na seguinte sequência: a) escolha da fêmea, exteriorizada por sua apreensão com as mãos do macho; b) prelúdio nupcial, com a escolha de um local propício à cópula, distribuição de alimento à companheira; excitação mútua por diversos "manejos pre-nupciais; c) acasalamento propriamente dito, com a emissão do pênis pelo macho e a fixação sôbre o solo; a transmissão do líquido fecundande da parte anterior do pênis à vulva da fêmea, pelo vai-vem da perambulação; d) separação pacífica dos dois, permanecendo o pênis abandonado no solo.

RESUMO

Estudos comparativos sôbre o aparelho genital masculino de *Tityus trivittatus* e *Tityus bahiensis* e sôbre o seu comportamento no acasalamento são apresentados.

A velha teoria de Dufour e Blanchard, de que os verdadeiros órgãos copuladores residiriam dentro de baínhas, ao lado dos testículos, é plenamente confirmada, sendo invalidadas as interpretações dêstes mesmos órgãos como simples "orgãos paraxiais", feitas por Pawlowsky, Birula, Werner e outros.

A verdadeira significação e função dos apêndices genitais externos dos machos é elucidada e, para evitar de futuro, maiores complicações terminológicas, é proposta para os mesmos a designação de "*styli genitales externi*", ao passo que se conserva a designação de "pênis" para o órgão copulador.

Foi assinalado, nas 2 espécies, que o "*vas deferens*" exerce dupla atividade, a gametogênica e a de transportar os espermatozoides às vesículas.

Foi verificado que, no acasalamento, abandonam os 2 hemipenes seus logares nas baínhas e, ao passarem pela fenda genital, se unem sòlidamente em um

único tubo, o pênis, que carrega em seu interior o líquido fecundante. Êste órgão é, após sua projeção, fixado sôbre o solo, diretamente por baixo da vulva da fêmea.

A "promènade à deux" é realizada por cima dêste órgão, de maneira que, no vai-vem da marcha, a vulva receba, ao roçar sôbre a parte anterior do pênis, os espermatozoides. Após a cópula, é o órgão masculino abandonado sôbre o solo, refazendo as baínhas novos hemipenes.

O processo do acasalamento é minuciosamente descrito e a significação dos *"styli genitales"* nos opérculos genitais, dos acúleos no pênis, do *spermatocleutrum* nas fêmeas é explanada.

SUMMARY

Comparative studies on the male genital apparatus of *Tityus trivittatus* and *T. bahiensis*, two South-American scorpion species, and their pairing habits are presented in this paper. The following facts were observed:

1. The *testes* are situated in the pre-abdomen. They are two white tubes, nearly parallel to the length of the body. In the adults, they are linked together, near the posterior part of the pre-abdomen and from this point a further central tube, parallel to the other, extends to the front. These three are linked by three or four horizontal tubes.

2. The two *vasa deferentia* have the same structure like the testes and the gametogenic activity is still exercised by the posterior and the anterior, vesicle-like, part. In *T. bahiensis* sometimes another ampoule is still present in the same region and may be designated as "secondary seminal vesicle".

3. The "vasa deferentia" lead to the two *"seminal vesicles"* and these open in the "cylindrical" glands.

4. Three pairs of accessory glands exist, to wit:

Two *"accessory anterior glands"* with very long ducts, situated one on each side on the inner face of the genital opercules. They discharge their products in the anterior part of the *ductus ejaculatorius;*

two *"oval, pyriform glands"*, situated near the seminal vesicles. Their ducts open in the inferior face of the ejaculatory duct, one on each side, very near the opening from the cylindrical glands;

two *:clyndlrical glands"*, long in size and with wider openings. Their body is elongated, with three ampoule-like parts. The last part is almost triangular.

The anatomical structure of these glands is nearly the same: a thin, external, circular muscle layer; a circular peritoneum; an epithellium with extremely long

cylindric cells and a "membrana basalis". All have a central "lumen", for discharging their products.

5. There are two *copulating organs* in *T. trivittatus* and *T. bahiensis*, as described already by Dufour and Blanchard in some African species and named by these authors as "fourreaux des verges" or "lames peniales" (Vachon). These organs, which are real "*hemipenes*" (Piza) and not "paraxial organs" (Pawlowsky, Birula, Werner and others), have a complex structure. They are surrounded by a thin, transparent layer, the "membrane". Both, hemipenis and membrane look like a tube, cut in half along the length. When recently formed, as after each mating, the hemipenes are flexible; but later become less elastic and more chitinous. Their anterior part is larger and not so densely chitinized. Their posterior portion has a sharp, extern, chitinized point, coming out sometimes through the membrana of the surrounding layer. The terminal portion is continued by a long, elastic, not chitinous "flagellum", also surrounded by the membrane.

This membrane constitutes the natural continuation of the ductus ejaculatorius.

6. The *ejaculatory duct* forms the "*camara genitalis*", in which open all the ducts of the accessory glands, the seminal vesicles and the two canals of the hemipenes.

7. Between the two "*opercula genitalia*" the ejaculatory duct opens. Two appendages exist on the inner, inferior side, designated as "*styli genitales externi*". Pawlowsky, Birula, Werner and others thougt that these were the true copulating organs, responsible for the transfer of spermatic liquid to the female. But they serve to the union of the hemipenes and to hinder the reentrance of the penis in the ejaculating duct.

8. The following facts summarize our observations on the *mating-habits* of *Tityus trivittatus* and *T. bahiensis*:

The mating may be divided into three periods:

First the male takes firmly the hands or the fingers of the female with his two broader pincers and begins to walk forwards or backwards, selecting a proper place for mating. Periods of rest interrupt this walk. Their pedipalps are carried horizontally in front and the caudae are bent upwards from their backs or dragged behind or sidewards.

Second, the two hemipenes and all the sexual and accessory glands are discharged into the ejaculatory duct. The hemipenes are united firmly into a single copulating organ, the penis. In his internal canal are the products of the seminal vesicles and of the other sexual glands.

The penis is projected and fixed on the soil. directly under the open vulva of the female. At the moment of ejaculation the male bents the cauda vertically, simulating a figure, designated by Fabre as "arbre droit".

In the final period of mating the seminal fluid is transferred from the penis to the vulva of the female, coming aut of the anterior, open part of the copulaitng organ (fixed over the soil). The "promènade à deux" is very careful.

9. The considerable degree of uniformity in the morphologic and anatomic structure of male sexual apparatus in the two studied species and the European, African and Mexican species, described by Pawlowsky, strongly suggests that all these species, even from different families, which have hemipenes ("paraxial-organs"-Pawlowsky), have also the same mating-habits as *T. trivittatus* and *T. bahiensis.*

10. The "nuptial prelude", described by Fabre, really includes the mating.

ZUSAMMENFASSUNG

Vergleichende Studien über die männlichen Geschlechtssorgane der beiden Skorpionarten Südamerikas, dem *Tityus trivittatus* und *T. bahiensis* werden dargelegt und die Begattungsweise der beiden Arten wird ausführlich beschrieben. Es wird hiermit überhaupt die Kopulation der Skorpione erstmalig beschrieben, da bisher nur Vermutungen und Hypothesen verzeichnet werden konnten. Folgende Tatsachen konnten beobachter werden:

1. Die *Hoden* liegen bei Jungtieren als zwei kurze vordere Längstränge an den Innenseiten des Prae-Abdomens, teilweise zwischen Leberfollikeln eingebettet. Allmählich wachsen sie weiter nach hinten und vereinigen sich schliesslich and der hintersten Grenze des Prae-Abdomens zu einem einzigen, gleichmässigen, weisslichen Hodenschlauche. Nahe der Verinigungsstelle wächst, mit zunehmender Geschlechtsreife. ein mittlerer Hodenschlauch nach vorne und entsendet jeweils nach links und rechts eine Seitenanastomose, die die äusseren Rohre erreichen. Die vollständig entwickelten Hoden beider Skospione bilden schliesslich eine Hufeisenfigur. die nach vorne offen ist, mit einem mittleren Längsstrang und drei vier Queranastomosen.

In den Hodenfollikeln befinden sich. fächerartig um ein Zentrallumen angeordnet, die Follikelfächer. In jedem Fach kann man eine bestimmte Menge von Keimzellen in einer bestimmten Entwicklungsphase sehen, angefangen von den Urspermatogonienden Spermatogonien. den Spermatocyten 1. und 2. Ordnung. den Prae-Spermiden bis zu den unreifen. fast reifen und vollständig

ausgebildeten Spermatozoen. Letztere sind unipolar angeordnet, verlieren aber diese Anordnung, wenn sie in die Samenblasen befördert werden.

2. Die *Vasa deferentia* sind im hinteren Abschnitt von den Hodenschläuchen nicht zu unterscheiden. Weiter nach worne werden sie allmählich dünner; wenden sich nach aussen, winden sich dorsal um die Kopulationsorgane und die Anhangsdrüsen herum; richten sich wieder nach innen, wobei sie wieder an Dicke zunehmen und münden schliesslich, vermittels einer "Ampulle" in die Samenblasen. Bei *Tityus bahiensis* kommt neben der Ampulle nicht selten noch weiterer Blindsack vor, eine Art von "vesicula seminalis accessoria" (Fig. 6: m). Die Vasa deferentia haben funktionell zwei Aufgaben: die der Samenleitung und, im Vorderteil und der Ampullenregion, die der Samenbereitung. In diesen beiden Abschnitten sind sie anatomisch kaum von den eigentlichen Hodenfolikeln zu unterscheiden. Selbst der mittlere, schmälere, Teil hat Urspermatogonienzellen und kann jederzeit, je nach Bedarf, zo Hoden umgewandelt werden.

Diese Bauart der Ausführwege der eigentlichen Hoden scheint uns sehr aufschlussreich sowohl in onto-wie auch in phyllogenetischer Hinscht und dürfte wohl ein Ausdruck der relativen Primitivität der recenten Skorpione darstellen.

3. Die beiden *Samenblasen* (Fig. 3 und 5; e) sind stets vorhanden und bilden ein längliches, ovales Säckchen, oft mit einer leichten, mittleren Einschnürung und einem etwas spitz zulaufenden Hinterende. Der relativ kurze Ausführkanal mündet in den Vorderteil der zylidrischen Drüse.

4. Die *Zylidrische Drüse* ist langgestreckt und gewunden (Fig. 3 und 5; f und i). Sie ist mit dem Rücken in eine rinnenförmige Längsfalte der Kopulationsorganscheiden eingekerbt und wird durch verschiedene Muskelbänder in dieser Lage gehalten. Der Hinterabschnitt der Drüse ist fast dreieckig und gewunden. Man kann sie von den Kopulationsorganscheiden sehr leicht lösen. Ihr langer Ausführgang mündet in den ductus ejaculatorius ein.

5. Die *"ovale Drüse"* (Fig. 6; d) liegt etwas vor der Ampulle des vas deferens (Fig. 5; g und g 1) und ihr langer, dünner Ausführgang führt parallel nebem dem der zylindrischen Drüse in den ductus ejaculatorius.

6. Vorne, links und rechts vom ductus ejaculatorius, liegt je eine *"vordere Anhangsdrüse* (Fig. 3 und 4; c), durch ihre gelbliche Färbung sehr leicht aus der Umgebung zu erkennen. Ihr Inhalt wird in den Vorderteil des ductus ejaculatorius geleitet.

Die Samenblase, der Endteil der vasa deferentia und die drei Paare von Anhangsdrüsen sind aussen mit einer zirkulär verlaufenden Muskelschicht ausgestattet. Ihre Kontraktion gestattet eine ruckartige Entleerung ihres Inhaltes.

7. Der *"ductus ejaculatorius"* bildet einen relativ weiten Genitalraum, in dem die Ausführgänge aller Drüsen zusammenlaufen. Mächtige Längs-und Quermuskeln ermöglichen eine Dehnung oder Raumverschiebung. Besonders an seiner Hinterseite verläuft ein starker vertikaler Druckmuskel, dessen Zusammenziehung eine *Auspresswirkung* in Richtung der Genitalöffnung bewirkt.

Der ductus ejaculatorius geht nach aussen in die unpaare Genitalöffnung über, die im Ruhezustande von den Genitalklappen verdeckt wird. An den Hinterseiten dieser Öffnung liegen die beiden *"Kopulationszangen"* (Fig. 2; b), von denen Pawlowsky und nach diesem Birula, Werner und andere behauptet hatten, sie wären die eigentlichen Kopulationsorgane, also für die Spermaübertragung vom Männchen zum Weibchen verantwortlich (Mit Recht hegte Werner den Verdacht, dass sie zu eigentlichen Kopulationsorganen nicht braunchbar wären). Um für immer eine irreführende Bezeichnung zu beseitigen, haben wir in dieser Arbeit die Bezeichnung *"Styli genitales externi"* vorgeschlagen. Es handelt sich um zwei winzige, unartikulierte Stiftchen, die, selbst bei geöffneten Genitalklappen, nur sehr schwer zu unterscheiden sind und deren Bedeutung später dargelegt werden soll.

Der ductus ejaculatorius teilt sich hinten in zwei Seitenäste (Fig. 4; h), deren schematischer Verlauf durch die Figur 5 (h und j) etwas klarer wird. Diese Seitenäste enthalten die eigentlichen *Kopulationsorgane*, deren Anfangsteile in Figur 4 (1) gekennzeichnet sind.

Wir möchten diese, im Querschnitt halbmondförmigen, Organe als *"Kopulationsorganscheiden"* bezeichen und das darinliegende, ebenfalls halbmondförmige, aus Chitin bestehende Organ, als Kopulationsorgan oder *"Hemipenis"*. Pawlowskys Bezeichnung dieser Bestandteile als "Paraxialorgane", der auch Werner beigepflichtet hat, besteht zu Unrecht. Die alte Meinung von Dufour und Blanchard, und neuerdings von Piza und Vachon ist die richtige. Hier handelt es sich unzweifelhaft um die richtigen Kopulationsorgane.

Diese Organe, je eines in einer Scheide, also zwei im Ganzen, haben die Form die in Figur 7 wiedergegeben ist. Ein breiter, stark chitinisierter Vorderkörper mit einem scharfen Seitenzacken (Fig. 9; q) setzt sich hinten in eine dünne Schwanzgeissel fort (Fig. 7; j), die ebenfalls von der Membrana umfasst wird (Fig. 8).

Durch Muskel-und erhöhtem Turgordruck werden auf dem Höhepunkte der Kopulation sowohl die beiden Samenblasen wie auch alle Anhangsdrüsen ruckartig in den *ductus ejaculatorius* entleert. Hierauf, ebenfalls durch Druckwirkung der Muskeln und des Blutes, rücken die beiden *"hemipenialen Stücke"*, von jeder Seite her eines, ebenfalls in den Geschlechskammerraum und fassen in ihren Hohlräumen die Geschlechtsdrüsenflüssigkeiten auf. Da sich nun die beiden Stücke, bei weiterem Vorrücken, vorne berühren (vergleiche Figur 4: l)

und, bei ihrem Durchgang durch die relativ enge Geschlechtsöffnung, ganz innig aneinandergepresst werden, vereinigen sie sich zum *definituven Kopulationsorgane,* dem *Penis.*

Um diese Vereinigung zu bewerkstelligen, sind die Seitenränder der Hemipenes falzig umgeschlagen, so dass die eine Hälfte genau in den Falz der anderen hineinpasst. Bei der Passage durch die Geschlechtsöffnung, werden die Falze durch den Drüsenkitt der vorderen Anhangsdrüsen befeuchtet. Diese Substanz erhärtet, bei Luftzutritt.

Beim Vergleichen der Figuren 7 (ein Hemipenis), 9 und 11 (vollständiges Kopulationsorgan), kann man die definitiva Verwachsung der bpeiden Hälften verfolgen. Figur 9 (o; p) zeigt noch die verbundenen Falzränder der ursprünglichen Hälften. Das definitive Kopulationsorgan bildet ein geschlossenes Rohr, in dessem Innerem sich die augeschiedenen Geschlechtsprodukte befinden. Das Rohr is nur vorne, an der kopfartigen Erweiterung, offen. (Figur 9).

8. Die *Kopulation* von *Tityus trivittatus* und *T. bahiensis* konnte oftmals beobachtet werden und spielt sich folgendermassen ab:

a) Auswahl der Partnerin:

Zur *Brunstzeit,* also im brasilianischen Spätfrühling (Monate Oktober bis Dezemberanfang), pflegen die Skorpione ihre Verstecke zu verlassen. Die grösseren und kräftiger gebauten Männchen suchen ihre Partnerinnen aus. An manchen gehen sie achtlos vorbei, während sich oft gleich zwei bis drei auf dasselbe Weibchen stürzen, bis dann schliesslich das gewandtere Männchen die Nebenhuhler durch kräftige Hiebe vertreiben kann. Bei der Partinerinwahl müssen gewisse "Brunststoffe" eine ausschlaggebende Rolle spielen und diese Stoffe müssen durch die weibliche Geschlechtsöffnung ausgeschieden werden; denn wir konnten immer beobachten, dass die Weibchen, deren Vulva durch den *Spermatocleutrumpfropf* verschlossen war, niemals von den Männchen ausgewählt wurden.

Männchen und Weibchen stellen sich Kopf gegen Kopf, das Männchen etwas höher und umfasst mit den Fingern der kräftigen Hände, von aussen her, die Hände der Partnerin.

b) Das Vorspiel und der Skorpiontanz:

Kaum liegen die Hände des Weibchens fest zwischen denen des Männchens, setzt auch schon der öfters beschriebene *Skorpiontanz* ein. Dieser besteht darin, dass das Männchen anfangs die Partnerin einfach mit sich schleppt, bald im Vorwärts-bald im Rückwärtsschritt, wobei an die 10 bis 20 Meter zurückgelegt werden können, um einen für die Kopulation *geeigneten Platz* ausfindig zu

machen. Dieser liegt nicht etwa tief in der Erde, in einem für das menschliche Auge verborgenen Verstecke, wie so oft vermutet wurde, sondern besteht einfach aus einem Stück glatten Bodens, irgendwo im Schatten. Niemals haben die Hunderte von Skorpionen von beiden Arten, die wir lebendig halten, zur Kopulation ihre Verstecke benutzt, obwohl sie, zu normalen Zeiten, regelmässig darunter hausen. Zur Brunstzeit verlassen sie gerade die Verstecke, kommen ans Tageslicht und vollziehen da die Begattung, um später wieder in ihre Verstecke zurückzukehren.

Ist der zweckmässige Platz erkoren, beginnt das *"Liebesspiel"*, das in einem mehr geregeltem Hin-und Herschreiten besteht, immer über der augsgewählten Stelle. Man möchte annehmen, dass damit ein Glätten und Austreten des Bodens erreicht werden soll. Am Ende angelangt, wird eine kurze Pause eingelegt. Das Männchen stösst mit der Stirne gegen die des Weibchens. Seine Mandibeln werden ständig vor und rückwärts bewegt und zwischen ihnen erscheint ein weisslicher *Speisebrei*, der der Partnerin zwischen die Mandibeln und auf die Stirnränder gelegt wird. Das Weibchen verhält sich sonst passiv; begleitet wohl alle Schritte des Männchens aktiv; ergreift aber von sich aus niemals die Initiative. Bringt man beide Tiere auf eine Glasscheibe, so lässt sich das Weibchen einfach vom Partner hin-und herschieben, ohne die Beine zu erheben.

Die "Promènade à deux" kann einige Minuten bis zu einer halben Stunde andauern; wird oft durch Ruhepausen unterbrochen und dient hauptsächlich dazu, die sexualle Erregung beider allmählich auf einen Gipfelpunkt zu treiben. Anfangs benutzte das Männchen noch die 4 Beinpaare zum Vor-und Rückschreiten; nun werden nur mehr die drei hinteren Paare dazu eingesetzt, wahrend das vorderste Paar heroben ist, dem Weichen unter das Prae-Abdomen greift und heftig seine Genitaloperkeln betrommelt. Dabei spielen die Kämme beider durch kräftiges Ein-und Auswärtsschwenken, durch Auf-und Niederbewegungen eine wichtige Rolle. Der männliche Körper wird wellenartig erschüttert. Mit zunehmender Erregung klappen allmählich beider Genitaloperkeln auf und die Geschlechtsöffnungen werden sichtbar.

Photo 1 zeigt eine Ruhepause beider Tiere und Photo 2 eine Phase des männlichen Rückwärtsschreiten.

c) Samenübertragung und Skorpiontanz:

Ist die Erregung beider, besonders des immer aktiven Männchens, auf den Höhepunkte angelangt, hält dieses plötzlich im Schreiten inne; erhebt das Post-Abdomen (Cauda) lotrecht (Photo 3), während das Weichen nur die drei letzten Schwanzglieder etwas hochstellt. Es entsteht so die von Fabre beschriebene Figur des "arbre droit". In dieser Stellung sammelt sich sowohl das

Blut wie auch der Darminhalt im Prae-Abdomen, was eine bedeutende Druckerhöhung zur Folge haben muss und unter diesem aufs Höchste gespanntem Drucke werden ruckartig die Geschlechtsdrüsen entleert und die beiden hemipenialen Stücke nach aussen gepresst, wo, wie schon erwähnt, erstmalig ihre vorderen Teile zum Kopulationsorgane verschmelzen. Durch einen letzten Druck der starken Muskelbündel an der Hinterseite des *ductus ejaculatorius*, wird dann der, beim Herausgleiten verschmelzende, Penis ausgeschleudert. Der Penis dringt nicht in die weibliche Vulva ein, sondern gleitet auf den Boden und klebt da mit seiner verderen Unterseite fest (durch den anhaftenden Stoff, der von den vorderen Anhangsdrüsen geliefert wurde) (Fig. 11). Die Schwanzgeissel des Kopulationsorganes bleibt jedoch auch jetzt noch mit den männlichen Geschlechtsorganen in Verbindung. Sie ist sehr dehnbar und kann, ohne zu reissen, um das 10 bis 30-fache ihrer natürlichen Länge, gedehnt werden.

Sofort nach dem Ausschleudern des Kopulationsorganes beginnt von neuem das Hin-und Herschreiten: nun jedoch sehr achtsam und regelmässig, so dass der Beobachter den Eindruck bekommt, es handle sich um einen Tanz. Beim Rückschreiten des Männchens kommt die Vulva des Weibchens genau über den offenen, vorderen Teil des auf dem Boden festhaftendem Kopulationsorganes, und kann die Spermamasse in sich aufnehmen; beim Vorwärtsschreiten des Männchens dringt das Hinterende dieses Gliedes naturgemäss wieder in seine Geschlechtsöffnung ein (da sich ja die elastische Schwanzgeissel wieder zusammenzieht) (Figur 9; r). Dabei hacken sich die beiden Seitendornen (Fig. 9; q) an den *"Styli genitales"* (Fig. 2; b) fest. Durch Zug der Geissel und Druck der schon von Narayanan beschriebenen Genitaldeckelmuskeln auf den Hinterteil des Kopulationsgliedes wird so ein weiterer Schub von Samenflüssigkeit an die vordere, offene Stelle gepumpt, um wieder, beim Rückwärtsschreiten, in die weibliche Vulva eingeführt zu werden.

Diese Pump-und Einführprozedur wird an die 10 bis 15 mal wiederholt, bis schliesslich das Weibchen aus seiner Apathie erwacht; sich mit kräftigem Rucke aus den männlichen Fingern befreit und diesem einige energische "Püffe" versetzt. Damit ist die Samenübertragung abgeschlossen. Friedlich sucht jedes Tier seinen Weg. Das Männchen wendet sich ab, wobei nun der bis aus Äusserste gespannte Geisselfaden zerreisst. Das Kopulationsglied bleibt unbeachtet an der Stelle kleben. Schon nach 5 bis 8 Wochen bilden die männlichen Hemipenisscheiden neue Organe aus, die aber erst wieder bei der nächsten Brunstzeit benützt werden.

Dass diese Beschreibung die erste Beobachtung der Paarung unter den Skorpionen überhaupt darstellt, ist nicht zu verwundern. Obwohl schon manche den Hochzeitstanz beschrieben hatten und auch schon photographieren konnten, hat doch niemand das kleine, bräunliche, unter den Partnern liegende Organ

aufgefunden, weil es sich farblich mit der Umgebung vermischt. Ausserdem mag es wohl bisher noch keinem Forscher gelungen sein, über ein so zahlreiches, lebendes, Skorpionmaterial zu verfügen, wie es uns gegönnt ist.

9. Wir hegen keinen Zweifel, dass das an *Tityus trivittatus* und *T. bahiensis* erstmalig beobachtete Gebaren bein der Begattung auch all den von Pawlowsky beschriebenen Skorpionarten, die ein sogenanntes "Paraxialorgan" besitzen, zukommt.

10. Die Ausführungen Werners, Birulas und anderer, die grösstenteils auf den Behauptungen Pawlowskys beruhen, müssen also wieder, im Sinne Blanchards, gedeutet werden.

11. Wenn wir die Ausdrücke "Hemipenis" und "Penis" für die halben und für das definitive Kopulationsorgan benutzten, so taten wir das um der Klarheit willen und um die Terminologie nicht noch mehr zu verwirren. Wir sind uns klar, dass ein Organ, das zur Samenübertragung auf das andere Geschlecht benutzt wird, aber dabei definitiv verloren geht und durch ein neues ersetzt wird, nicht ohne Weiteres als "Penis" bezeichnet werden sollte. Andererseith handelt es sich aber auch um keine Gebilde, die man sonst als "Spermatophoren" benennt.

12. Aus den Ausführungen dieser Arbeit wird auch die Tatsache ersichtlich, dass, obwohl bei den meisten Skorpionarten das Verhäaltnis der Männchen zu den Weibchen wie 1:3 oder 1:5 liegt, dennoch das biologische Gleichgewicht mit der Garantie des Überlebens der Art besteht. Bei vielen Arten mag eine einzige Samenübertragung für das ganze Leben des Weibchens ausreichen, da diese die Spermatozoen in ihrem Körper jahrelang lebendig erhalten können und alljährlich 15 bis 20 Junge zur Welt bringen können.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos técnicos, auxiliares e serventes do Laboratório de Zoologia Médica. cuja dedicação e espírito de colaboração nos possibilitou êste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. Pawlowsky, E. N. — On the morphology on the male genital apparatus in scorpions. Trans. Soc. Nat. Leningrad 53: 18-86, 1924.
2. Werner, F. — Scorpiones, Pedipalpi. Bronn's Klassen und Ordn. d. Tierreiches 5. IV (8): 155-165, 1935.
3. Vachon, M. — Études sur les scorpions. Inst. Pasteur d'Algérie, Alger, 1952.

4. Piza, Jr. de Toledo, S. — Observações sobre o aparelho reprodutor e a reprodução de *T. bahiensis*. Jorn. de Agronomia, Piracicaba, Brasil, 2 (1): 49-59, 1939.

5. — Sobre os orgãos copuladores dos escorpiões. Ibidem 2 (4): 285-291, 1939.

6. — Estudos antomicos em escorpiões brasileiros. Rev. de Agricultura, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 15 (5-6): 215-228, 1940.

7. — Meiose no macho do escorpião brasileiro. Ibidem 18 (7-8): 228-248, 1943.

8. Dufour, L. — Histoire anatomique et physiologique des scorpions. Inst. Franc., Savants étrangers 14: 561-565, 1856.

9. Blanchard, E. — L'organisation du règne animal. Paris, 30 fasc.: 1-232, 1851-1864.

10. Narayanan, M. — Notes on the anatomy of scorpions. External sexual characters. Quart. J. Micr. Sci. 30: 121-124, 1889.

11. Birula, A. — Über *Scorpio maurus* L. und seine Unterarten. Horae Soc. ent. Rossicae 1: 115-192, 1910.

12. Fabre, J., H. — Souvenirs entomologiques; neuvième série. Delagrave, éd. Paris: 1-374, 1907.

13. Maccary, A. — Mémoires sue le scorpion que se trouve sur la montagne de Cette, Cabon éd. Paris: 1-48, 1910.

ERRATA

Dos numerosos erros tipográficos existentes no trabalho de W. H. A. Schöttler "Lista suplementar de bibliografia sôbre venenos animais publicada nos anos de 1863 até 1946" (Mem. Inst. Butantan 26: 7-73; 1954), devem ser desde logo rectificados aqueles que tornam difícil, ou mesmo impossível, o encontro da literatura citada, a saber:

pag.	lin.	
pag. 15,	lin. 34:	Bdyth = Blyth
" 17,	" 25:	193 = 1903
" 18,	" 14:	inserir "5:" entre "Cirurg." e "297"
" 22,	" 8:	628 = 683
	" 18:	1927 = 1937
	" 20:	644 = 646
	" 38:	Coohdge = Coolidge
	" 36:	122 = 1922
	" 39:	Cand. = Canad.
pag. 25,	" 6:	Centralol. = Centralbl.
" 28	" :	substituir lin. 30 e 31 por "Feldhausen, M. — Über die Einwirkung des Daboiagiftes auf die Nieren. (The-"
" 31,	lin. 8:	1863 = 1893
" 32,	" 13:	Gleny = Glenny
" 34,	" 10:	2 = ?
	" 11:	1864 = 1867
pag. 35,	" 3:	anaemia = haemorrhage
" 44,	" 16:	38 = 365
" 48,	" 6:	Zoll. = Zool.
" 49,	" 27:	128 = 28
" 50,	" 12:	inserir "?: 27; 1907)." depois "nat."
" 51,	" 12:	1925 = 1935
" 53,	" 35:	194 = 1924
" 54,	" 34:	Rept. = Dept.
" 61,	" 22:	inserir "(Boll. mens. Accad. Gioenia Sci. nat. Catania?: 2; 1891)." depois "L."
" 66,	" 4:	9 = ?
" 69,	" 16:	9 = ?
	" 20:	inserir "Nac." entre "Esc." e "Cienc."
pag. 71,	" 22:	1045 = 1405
" 73,	" 26:	Adelaire = Adelaide